

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacología**



**TESIS DOCTORAL**

***“Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico”***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de la Cabeza Fernández Fernández

Directores

M<sup>a</sup> Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado  
Irene Iglesias Peinado  
Ángel María Villar del Fresno

**Madrid, 2012**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Farmacología**

***“Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K:*  
Estudio Fitoquímico y Farmacológico”**





**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Farmacia**  
**Departamento de Farmacología**

**Memoria para optar al grado de  
Doctor en Farmacia presenta:**

**María de la Cabeza Fernández Fernández**

D. ÁNGEL M<sup>a</sup> VILLAR DEL FRESNO, Catedrático del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Dña. PILAR GOMEZ-SERRANILLOS CUADRADO y Dña. IRENE IGLESIAS PEINADO, Profesoras Titulares de dicho departamento,

CERTIFICAN:

Que la memoria que lleva por título “*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K: Estudio Fitoquímico y Farmacológico”, presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. M<sup>a</sup> de la Cabeza Fernández Fernández, ha sido realizada en este Departamento, bajo su inmediata dirección y asesoramiento, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente

Madrid 21 Noviembre 2011

M<sup>a</sup> Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Irene Iglesias Peinado

Ángel M<sup>a</sup> Villar del Fresno

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Ángel M<sup>a</sup> Villar del Fresno por estar siempre a mi lado y darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y permitirme desarrollarlo en este Departamento bajo su atenta mirada. Le tengo que agradecer los ánimos que siempre me ha dado y el cariño que me ha infundido en cada momento.

A la Dra. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado por haberme ayudado día tras día a la realización de este trabajo y por regalarme su amistad incondicional incluso en los momentos más difíciles. Siempre irá en mi corazón por toda la dedicación que me ha prestado, toda la ayuda, apoyo y el ánimo que he recibido de su parte. Nunca ha dejado que el desanimo aflorara y siempre ha dado luz en los momentos de oscuridad. Aún recuerdo algún abrazo profundo que sin palabras expresábamos nuestros sentimientos, nunca cambies eres única y excepcional y eso te hace especial. Este trabajo no hubiera sido posible sin ella.

A la Dra. Irene Iglesia Peinado por el apoyo y la colaboración mostrada desde el principio.

A la Dra. M<sup>a</sup> Emilia Carretero Accame por todos sus buenos consejos y sobre todo por su amistad, siempre he sentido su cariño y su fuerza dando palabras de apoyo así como sus inestimables orientaciones y ayuda.

A todos y cada uno de los miembros del Departamento, siempre he sentido mucho cariño y simpatía hacia mí. En cada gesto y expresión he podido observar vuestro gran apoyo e interés en la finalización de este trabajo.

A Mavi, Cristina, Elena, Almudena porque han sido unos años maravillosos y un tiempo compartido imborrable.

A mi marido llevo años apoyándome en él y sin su ayuda y paciencia nunca hubiera conseguido realizar esta tesis. Siempre ha comprendido mis problemas y sin su cariño y apoyo me habría sido imposible afrontar con éxito este trabajo.

A mi padre porque hay cosas que no se aprenden en los libros y él ha sido capaz de enseñarme desde pequeña para ser lo que soy. Sus consejos y su ejemplo han sido siempre un referente para mí.

A mi madre por aguantar con paciencia mi desánimo. Eres única y especial le tengo que agradecer que siempre está ahí pase lo que pasé y ocurra lo que ocurra. No sería nada ni nadie sin ella inculcándome su sentido común y su gran conocimiento de la vida.

A Claudia "mi nenita" un pequeño milagro que cada vez que me sonrío o me echa sus brazos me hace sentir la madre más orgullosa del mundo.

**a mi familia**

## **ABREVIATURAS**

CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño molecular
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CoA	Coenzima A
CYTED	Ciencia y Tecnología para el desarrollo
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
IR	Infrarojo
MHz	Megahertzio
PDA	Detectores de fotodiodos array
RMN	Resonancia magnética nuclear
T <sup>a</sup>	Temperatura
TFA	Trifluoracético
SNC	Sistema Nervioso Central
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visible



# ÍNDICE

<b>A. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>B.1 Descripción botánica.....</b>	<b>6</b>
B.1.1 Taxonomía .....	6
B.1.2 Nombres vernáculos.....	6
B.1.3 Descripción botánica y hábitat .....	7
B.1.4 Estudio fitoquímico.....	8
B.1.4.1 Hojas .....	8
B.1.4.2 Corteza.....	9
B.1.4.3 Fruto.....	10
B.1.5 Usos Etnomedicinales .....	11
B.1.6 Farmacología y Fitoterapéutica.....	13
B.1.6.1 Actividad antiinflamatoria y espasmogénica .....	13
B.1.6.2 Actividad antimicrobiana.....	14
B.1.6.3 Actividad antidiabética .....	15
B.1.6.4 Actividad sobre el Sistema Nervioso Central .....	16
<b>B.2 Métodos de estudio farmacológico .....</b>	<b>19</b>
B.2.1 Métodos de estudio .....	19
B.2.2 Métodos para el estudio de la actividad sobre el SNC.....	21
<b>B.3 Compuestos polifenólicos .....</b>	<b>26</b>
B.3.1 Origen.....	26
B.3.2 Clasificación.....	28
B.3.3 Métodos de extracción .....	30
B.3.4 Métodos de aislamiento y purificación .....	31
B.3.4.1 Cromatografía en capa fina .....	31
B.3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) .....	32
B.3.5 Propiedades de los polifenoles .....	34

<b>C. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
<b>C.1 Material biológico .....</b>	<b>38</b>
C.1.1 Material vegetal .....	38
C.1.1.1 Recolección.....	38
C.1.1.2 Dsecación .....	38
C.1.1.3 Pulverización y almacenamiento .....	38
C.1.2 Material de origen animal .....	39
<b>C.2 Estudio micrográfico de la droga .....</b>	<b>39</b>
C.2.1 Montaje de las preparaciones.....	40
<b>C.3 Método de extracción .....</b>	<b>40</b>
<b>C.4 Estudio fitoquímico preliminar .....</b>	<b>42</b>
C.4.1 Screening fitoquímico.....	42
C.4.2 Cromatografía en capa fina.....	43
<b>C.5 Pruebas farmacológicas .....</b>	<b>46</b>
C.5.1 Toxicidad .....	46
C.5.1.1 <i>In vivo</i> : Cálculo de la DL <sub>50</sub> .....	46
C.5.2 Test de Irwin .....	47
C.5.3 Estudios Neurofarmacológicos .....	51
C.5.3.1 Test de la Actividad Motora Espontánea .....	52
C.5.3.2 Test de la Curiosidad .....	52
C.5.3.3 Test de la Temperatura Rectal .....	53
C.5.3.4 Test de la Coordinación Motora. ....	54
C.5.3.5 Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico. ....	55
C.5.4 Otras Pruebas Farmacológicas Generales.....	56
C.5.4.1 Actividad Antiinflamatoria .....	56
C.5.4.2 Actividad Analgésica .....	57
<b>C.6 Fraccionamiento del extracto diclorometánico.....</b>	<b>59</b>
C.6.1 Estudio previo mediante Cromatografía en Capa Fina .....	59
C.6.2 Cromatografía en columna.....	59
C.6.3 Seguimiento de las fracciones mediante CCF .....	60
C.6.4 Identificación de compuestos .....	61

<b>C.7 Aislamiento biodirigido del extracto hidroalcohólico .....</b>	<b>62</b>
C.7.1 Restitución .....	62
C.7.1.1 Humedad, pH y acidez total.....	64
C.7.1.2 Compuestos polifenólicos .....	66
C.7.1.3 Taninos condensados totales .....	67
C.7.1.4 Identificación de fenoles mediante HPLC .....	68
C.7.2 Eliminación de complejos macromoleculares .....	69
C.7.3 Separación de los componentes por HPLC.....	73
C.7.4 Estudio farmacológico .....	74
<b>D. RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>D.1 Rendimiento de los procesos de extracción .....</b>	<b>77</b>
<b>D.2 Estudio micrográfico .....</b>	<b>77</b>
<b>D.3 Estudio fitoquímico preliminar .....</b>	<b>78</b>
D.3.1 Screening fitoquímico.....	78
D.3.2 Cromatografía en capa fina.....	79
<b>D.4 Estudio farmacológico de los extractos.....</b>	<b>80</b>
D.4.1 Toxicidad .....	80
D.4.1.1 <i>In vivo</i> . Cálculo de la Dosis Letal 50 (DL <sub>50</sub> ) .....	80
D.4.2 Test de Irwin .....	84
D.4.3 Estudios Neurofarmacológicos .....	89
D.4.3.1 Test de la Actividad Motora Espontánea.....	89
D.4.3.2 Test de la Curiosidad .....	91
D.4.3.3 Test de la T <sup>a</sup> Rectal .....	93
D.4.3.4 Test de la Coordinación Motora. ....	95
D.4.3.5 Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico. ....	97
D.4.4 Otras Pruebas Farmacológicas Generales.....	98
D.4.4.1 Actividad Antiinflamatoria.....	98
D.4.4.2 Actividad Analgésica.....	100
<b>D.5 Fraccionamiento del extracto diclorometánico.....</b>	<b>102</b>
D.5.1 Estudio previo mediante CCF.....	102
D.5.2 Cromatografía en columna .....	103
D.5.3 Esquema del fraccionamiento del extracto diclorometánico .....	104
D.5.4 Identificación de compuestos .....	110

<b>D.6 Aislamiento biodirigido del extracto hidroalcohólico .....</b>	<b>113</b>
D.6.1 Restitución .....	113
D.6.1.1 Humedad, pH y acidez total .....	114
D.6.1.2 Compuestos polifenólicos.....	115
D.6.1.3 Taninos condensados totales .....	116
D.6.1.4 Identificación de fenoles mediante HPLC.....	117
D.6.2 Eliminación de complejos macromoleculares .....	119
D.6.3 Estudio farmacológico .....	122
<b>E. DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>F. CONCLUSIONES.....</b>	<b>130</b>
<b>G. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>

## **A. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El reino vegetal ha sido desde la antigüedad una fuente inagotable de recursos farmacológicos, usados popularmente para el control de una gran diversidad de enfermedades.

Una parte importante de este reino lo constituye la flora iberoamericana, sobre la cual existe una amplia información etnofarmacológica, que permite atisbar alternativas terapéuticas para el tratamiento de numerosas enfermedades actuales.

El grupo dirigido por el Dr. Ángel M<sup>a</sup> Villar del Fresno en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, con amplia trayectoria en la investigación de plantas medicinales, comenzó el estudio preliminar de la actividad neurofarmacológica de especies vegetales procedentes de Guatemala, dentro del proyecto de colaboración con el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). El proyecto CYTED incluye una serie de ensayos y pruebas que abarcan distintos campos de la Farmacología. Dentro de los ensayos que este Departamento realiza para dicho programa, se encuentran los test de actividad sobre el Sistema Nervioso Central (SNC).

El interés de estos ensayos radica en la necesidad de búsqueda de nuevos principios activos que actúen entre otros a nivel del SNC. Ello sería de gran utilidad debido al aumento de diversas enfermedades entre ellas las de tipo neurológico como ansiedad, depresión o estrés que actualmente afectan a un porcentaje relevante de la población mundial.

La cualidad singular de los fármacos que afectan al SNC y al comportamiento sitúa a los farmacólogos que estudian este sistema en medio de uno de los desafíos científicos fundamentales: tratar de conocer la base celular y molecular de las funciones enormemente complejas y variadas del cerebro humano. En este esfuerzo, las investigaciones tienen dos objetivos principales: aislar compuestos para investigar los mecanismos celulares y moleculares que operan en el SNC, y desarrollar nuevos fármacos apropiados para corregir las alteraciones fisiopatológicas del mismo.

La especie vegetal objeto de este trabajo de investigación, formando parte de la batería de plantas recogidas en este proyecto por su interés medicinal, *Byrsonima*

*crassifolia* (L.) H.B.K fue seleccionada a partir de un screening preliminar, en el que la planta presentó una clara actividad a nivel del Sistema Nervioso Central

*B. crassifolia* es una especie que crece en diversas zonas de Iberoamérica. El escaso conocimiento que existe acerca de la composición química de la corteza de esta planta y de sus acciones farmacológicas nos animó a emprender su estudio fitoquímico y farmacológico de esta especie.

Así, en los trabajos previos conducentes a la Tesina de Licenciatura, se estableció que el extracto hidroalcohólico de esta especie presentaba una acción depresora del SNC.

Sobre esta base, se iniciaron los trabajos de Tesis Doctoral con un estudio en profundidad para determinar su composición química y acción farmacológica. En la revisión bibliográfica previamente realizada apenas se encontraron aportaciones acerca de los efectos depresores de *B. crassifolia*. Ello nos animó a profundizar en esta línea con el fin de corroborar y completar el trabajo anteriormente mencionado, empezando por el aislamiento y elucidación estructural de los principios activos que pudieran ser responsables de la actividad e intentando determinar sus posibles mecanismos de acción. La finalidad principal por tanto del trabajo es la de poder aportar nuevos y mejores agentes depresores, dada la importancia que este tipo de compuestos posee.

Los objetivos fijados para este trabajo de investigación son los siguientes:

- Llevar a cabo una revisión bibliográfica de las características farmacológicas, terapéuticas y fitoquímicas de *B. crassifolia*.
- Realizar el estudio fitoquímico que nos permita poner de manifiesto los principales grupos químicos de la especie en estudio, identificando los principios activos responsables de la actividad depresora a nivel del SNC de la especie en estudio.
- Determinar la actividad farmacológica a nivel del SNC, ya detectada en anteriores trabajos del grupo
- El objetivo final del presente trabajo de investigación es ayudar a encontrar nuevos compuestos depresores del SNC eficaces y seguros dada la elevada importancia de trastornos de este tipo en la actualidad.



## **B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## B.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

### B.1.1 Taxonomía

La especie *B. crassifolia* se incluye en la siguiente clasificación taxonómica:

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Geraniales
Familia:	Malpighiaceae
Género:	<i>Byrsonima</i>
Especie:	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) H.B.K (Cronquist, A. 1981)

Son sinónimos: *B. cubensis* Juss., *B. karwinsiana* Juss., *B. lanceolata* Poiret, *B. moureila* Aublet, *B. cotinifolia* H.B.K., *B. rhopalaefolia* H.B.K., *B. pulcra* D.C., *B. oaxacana* Juss., *B. rufescens* Bertolini, *B. laurifolia* (L.) H.B.K. var *guatemalensis* y *Malpighia crassifolia* L.

### B.1.2 Nombres vernáculos

Español: indano, nance, nance blanco, nanche, nancite, nancito, chaparro de chinche, chaparro de sabana, chaparro peralejo, chaparro manteco, manteco, manteco sabanero, manero, crabo, marushi, maricas, maricao, cimarrón, peralejo, peralejo blanco, peralija, changugo, tapal, yoco.

Portugués: murici, murici do campo, murici da praia crabo, cangica.

Inglés: golden spoon, nance bark, savanna serette.

Francés: maurissi, moureiller des Caraïbes, moureiller des savanes, morissi.

### B.1.3 Descripción botánica y hábitat

*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. (Malpighiaceae) es un árbol de 4 a 8 m de altura con copa amplia y abierta o irregular. La corteza se desprende en placas cuando es adulto. Las ramillas nuevas presentan pubescencia herrumbrosa. *B. crassifolia* es un árbol tropical nativo de México, Antillas y América tropical. Está ampliamente distribuido a lo largo del Golfo de México y la costa Oeste de este país, así como en distintas regiones de América Central y Sudamérica, siendo considerado parte de la sabana neotropical.

Etimológicamente, el nombre de la especie procede del latín *crassifolius-a-um* = de hojas gruesas.

Crece desde el nivel del mar hasta los 1800 m de altitud. En Venezuela es un árbol característico de la vegetación sabanera de Los Llanos, típico de terrenos pobres, secos y a menudo degradados por cultivos. Suele crecer asociado con otros árboles también llamados “chaparros”, como *Curatella americana* (Bernal y Correa, 1998).

Su hábitat se encuentra en laderas abiertas y pedregosas del bosque tropical caducifolio, así como en laderas de cerros formados por rocas metamórficas y terrenos planos. Crece en clima cálido y húmedo, tropical o subtropical, en suelo rocoso, arenoso y alcalino, adaptándose a oxisoles y ultisoles bien drenados (Cáceres, 1996).

Puede soportar condiciones de drenaje rápido o con drenaje deficiente que se inundan en la época húmeda y se secan en período de sequía. Se observa en áreas de cultivo abandonado.

El fruto es comestible, presenta sabor agradable y es suave, cualidades intrínsecas en su denominación: *xocotl*: fruto ácido; *nantzi*: madres o mujeres ancianas. Se conocen popularmente como “nanche”, presentando un sabor característico en crudo o cuando se utiliza para la elaboración de golosinas y bebidas alcohólicas dulces (es de forma redonda, de 1-2 cm de diámetro). Desprovisto de la piel es de color amarillo, con una pulpa suave y desarrolla un aroma característico e inusual a queso debido a su

composición química (Alves y Franco, 2003). Los frutos son comestibles y se venden en mercados locales, aunque también se han utilizado en medicina tradicional como antidiabéticos (Perez- Gutierrez et al., 2010)

Las hojas son opuestas, obovado-elípticas, cortamente acuminadas, de base estrecha, de 4 a 15 cm de longitud, con el envés pubescente. La nerviación es marcada y la textura es coriácea. Forma racimos terminales erectos de 5 a 15 cm de longitud, con el eje tomentoso.

Las flores son de color amarillo-anaranjado, de 1 a 1,5 cm de diámetro, con pétalos unguiculados. El fruto es una drupa de 8 a 12 mm de diámetro, piel delicada, amarilla; la pulpa es blanca, de unos 5 mm de espesor, jugosa, agrisada y con un olor peculiar; la semilla es grande, de color negro y consistencia muy dura (Morton, 1981; Stanley, 1946 en Gupta, 1995). Presenta una semilla por fruto.

En cuanto a su cultivo, se localiza en Colombia, en las regiones de Antioquía, Boyacá, Cundinamarca, Córdoba, Huila, Magdalena, norte de Santander y Tolima. Prospera en suelos silíceo-arenosos en los que no supera los 3 m de altura (Gupta, 1995).

Se multiplica por semillas y esquejes. Requiere un clima cálido y suelos fértiles, no siendo demasiado exigente en riegos.

#### **B.1.4 Estudio fitoquímico**

El género *Byrsonima* presenta una serie de compuestos comunes a varias especies: flavonoides como isoqueratina, quercetol o 3- arabinosilquercetol; triterpenos como ácido aleanólico, ursólico  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina; esteroides, saponósidos, taninos etc...

##### **B.1.4.1 Hojas**

A partir de las hojas se han aislado diferentes tipos de principios activos: triterpenos (betulinaldehído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico, ácido

2- $\beta$ -hidroxioleanólico, ácido 2- $\alpha$ -hidroxioleanólico y ursenaldehído), esteroides ( $\beta$ -sitosterol y su glucósido, daucosterol), flavonoides, su 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y su 3-O-(6''-galoil) galactósido, un éster aromático (galato de metilo), cuatro aminoácidos comunes (alanina, ácido aspártico, prolina y valina), dos aminoácidos no protéicos (ácido piperídico y ácido 5-hidroxipiperídico) y numerosos sulfonoglicolípidos y glicolípidos (Bejar et al, 2000; Cáceres et al., 1996)

El contenido en polifenoles totales en las hojas procedentes de diferentes localidades del Estado de Pará (Brasil) es de 45,5 mg (equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca), mientras que su contenido en flavonoides totales es de 11,71 mg (equivalentes de catequina por gramo de planta fresca) (Silva et al., 2007). En las muestras procedentes en concreto de Igarapé-açu y Bonito se obtuvieron contenidos de 58,1 mg y 9,4 mg por gramo de planta seca, respectivamente (Souza et al., 2008).

A partir del extracto metanólico de hojas de *B. crassifolia* recolectadas en el Departamento de Quiché (Guatemala), se identificaron 10 compuestos conocidos (ácido oleanólico y derivados, lupeol, (+) catequina, (-) epicatequina y dos heterósidos de quercetina) y cuatro nuevos glicósidos: 1,2-di-O-miristoil-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol; 1,2-di-O-(8-hexadecanoil)-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol; 1,2-di-O-palmitoil-3-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-glicerol y 1,2-di-O-(8-hexadecanoil)-3-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-glicerol.

#### **B.1.4.2 Corteza**

Se han publicado numerosos estudios sobre la composición química de la corteza del árbol, aislándose compuestos triterpénicos como la  $\beta$ -amirina, un acetato triterpénico y varias proantocianidinas dímeras y trímeras conteniendo unidades de (+)-epicatequina y (+)-epigallocatequina con configuración 2S, poco abundante en la naturaleza (Béjar et al., 2000). La corteza procedente de muestras recogidas en Oaxaca (México) mostró la presencia de compuestos fenólicos como: catequina y (+)-epicatequina, junto con ácido gálico, dos nuevos trímeros de procianidina y cuatro nuevos dímeros (Geiss et al., 1995).

La determinación de polifenoles y flavonoides totales realizada en corteza recolectada en el Estado de Pará (Brasil) rindió un contenido en principios activos muy cercano al obtenido para las hojas y muy superior al encontrado en los frutos: 38,0 mg en equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca y 11,0 mg de equivalentes de catequina por gramo de planta fresca, respectivamente (Silva et al., 2007). En las muestras obtenidas en Igarapé-açu y Bonito, el contenido en principios activos de este tipo en la corteza fue muy superior al obtenido en las otras partes del árbol analizadas (hojas y frutos): 121 mg y 16,2 mg por g de planta seca, respectivamente (Souza et al., 2008).

Estos contenidos en principios activos son similares a los obtenidos en otras especies del género *Byrsonima*. En la región noreste de Brasil, *Byrsonima microphylla* crece especialmente en los bancos de arena del Estado de Bahía, en forma de árbol pequeño. A partir del extracto clorofórmico del tallo de esta especie se aislaron dos nuevas naftoquinonas (3,7-dihidroxi-2-metoxi-8,8,10-trimetil-7,8-dihidro-6H-antracen-1,4,5-triona; 3-hidroxi-2-metoxi-8,8,10-trimetil-8H-antracen-1,4,5-triona), un posible derivado de éstas, un nuevo triterpeno ( $\Delta^1$ -lupenona), un flavanol [(2S,3S)-3'-hidroxi-4'-5,7-trimetoxi-flavan-3-ol] y los compuestos conocidos lupeol,  $\beta$ -amirina y betulina (Aguilar et al., 2005).

El extracto metanólico de hojas de *Byrsonima intermedia* A. Juss. procedente de Pratania (San Pablo, Brasil) contiene esteroides, taninos y flavonoides: quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosido, (+) catequina, (-) epicatequina, ácido gálico, galato de metilo, quercetin-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosido, amentoflavona, quercetin-3-O-(2''-O-galoil)- $\beta$ -galactopiranosido, quercetin-3-O-(2''-O-galoil)- $\alpha$ -arabinopiranosido y quercetina<sup>i</sup>, perfil similar al obtenido para *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK) recolectada en Puerto Nacional (Brasil) (Bonacorsi et al., 2009; Cardoso et al., 2006; Sannomiya, M et al., 2005), aunque esta última presenta un mayor contenido en amentoflavona.

#### **B.1.4.3 Fruto**

El fruto contiene una serie de compuestos volátiles que le confieren su peculiar aroma: etanol (28,3%), hexanoato de etilo (25,1%), ácido butanóico (5,1%), ácido hexanóico (5,1%) y butirato de metilo (2,8%). En su composición química se encuentra

también un elevado número de azúcares, minerales, vitamina C, riboflavina, grasa y fibras (Alves y Franco, 2003).

Recientemente, se ha determinado el contenido en polifenoles totales del fruto debido a su interés como antioxidante, con capacidad protectora frente a diversas afecciones. Los frutos recogidos en el Estado de Pará (Brasil) presentan un contenido en polifenoles totales de 0,8 mg (equivalentes de ácido gálico por gramo de planta fresca) y un contenido en flavonoides totales de 0,12 mg (equivalentes de catequina por gramo de planta fresca) (Silva et al., 2007). Las muestras recogidas en las localidades de Igarapé-açu y Bonito (estado de Pará, Brasil) presentaron unos valores algo más elevados: 2,9 mg y 0,2 mg, respectivamente (Souza et al., 2008). Sin embargo, estos contenidos son siempre inferiores a los presentes en las hojas y la corteza.

### **B.1.5 Usos Etnomedicinales**

*B. crassifolia*, popularmente conocida como “nanche”, es un árbol tropical ampliamente distribuido en varias regiones de México, América central y Sudamérica; su valor medicinal es conocido y utilizado en estas regiones desde la época precolombina (Béjar et al., 2000).

Aparece recogida en la obra “Historia de las Plantas de Nueva España” de Francisco Hernández, bajo el nombre de “nantzinxocotl”. Este es uno de los textos escritos en el siglo XVII con el fin de describir los tratamientos naturales indígenas, utilizados por las civilizaciones Maya y Azteca con plantas medicinales en México. En dicho texto se recogen no sólo los datos de botánica médica, sino también conceptos de salud, terapéutica, agricultura, ecología, zoología, geología y otras circunstancias naturales; a su vez, el texto incluye las nuevas ideas y prácticas europeas sobre los aspectos descritos.

En la citada obra se describe: “*la corteza de las ramas es astringente y su naturaleza es fría y seca. El polvo cura las úlceras; se aplica en forma de lavados para disolver la inflamación de las piernas*”. También se administra a mujeres embarazadas con el fin de fortalecerlas.

Fue utilizado en medicina tradicional por diversos grupos étnicos como los indios Mixe de Oaxaca y los zoques, tzeltal y tzotzil de Chiapas (México); aún hoy en día se encuentra entre las diez plantas más utilizadas para trastornos gastrointestinales en el Estado de Oaxaca (Bejar y Malone, 1993; Martinez-Vazquez, M et al., 1999) tratamiento de diarrea y disentería, así como para inducción del parto, para el flujo vaginal y el tratamiento de estomatitis. Tradicionalmente se consume vía oral la decocción en agua de la corteza o las hojas por vía oral, para el tratamiento de resfriados, infecciones cutáneas y mordeduras de serpiente.

También se ha descrito el uso de las hojas y la corteza para el tratamiento del dolor de dientes, vaginitis, diarrea, bronquitis y asma en diferentes regiones de la Península de Yucatán (Peraza-Sanchez, et al., 2007), así como para el tratamiento de trastornos inflamatorios en Centroamérica (Maldini et al., 2009)

La decocción de la corteza del árbol, junto con otras once plantas, se vende en los mercados indios de México con las siguientes indicaciones: facilitar la digestión, limpiar el estómago, estimular el apetito, purgar el vientre de la mujer tras el parto, inducir la secreción láctea y dar fortaleza a la mujer. El tronco se utiliza a menudo para curtir y teñir el algodón, siendo su madera muy valiosa en la construcción y la fabricación de carbón vegetal (Bernal y Correa, 1998).

Los datos etnobotánicos e históricos indican que las partes y usos de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. son:

- Corteza: para favorecer el sangrado en las mujeres, expulsión durante el parto y mordedura de serpientes. Colitis crónica.
- Hojas: febrífugo, para expulsar la placenta y para el tratamiento de diarrea.
- Fruto: para el tratamiento de la fiebre.
- Corteza y ramas: para disminuir la pérdida de dientes y como veneno para pescar (Gupta, 1995).
- Semilla del fruto: para la disentería (Béjar y Malone, 1993).



## B.1.6 Farmacología y Fitoterapéutica

Basándose en los usos tradicionales de la especie, se han realizado numerosos estudios farmacológicos que intentan validarlos, así como identificar los principios activos responsables de la actividad observada y su posible mecanismo de acción.

### B.1.6.1 Actividad antiinflamatoria y espasmogénica

Recientemente, se han publicado datos sobre las propiedades antiinflamatorias de diferentes especies vegetales utilizadas en medicina tradicional en Centroeuropa en forma de decocción, infusión o baños, para el tratamiento de varios trastornos inflamatorios (Maldini et al., 2009). Los ensayos realizados con diferentes extractos de la corteza de *B. crassifolia* (éter de petróleo, cloroformo y metanol) demuestran una elevada actividad antiinflamatoria tópica para los extractos lipofílicos, siendo éstos mucho más activos que el extracto polar, el cual es, sin embargo, el más utilizado popularmente.

Los extractos etanólico y acuoso de la corteza de *B. crassifolia* han mostrado una buena actividad antiinflamatoria en los ensayos de inhibición de la ciclooxigenasa y de HET-CAM, y actividad antimicrobiana. Por otra parte, extractos de hojas y corteza presentan efecto espasmogénico dependiente de la concentración en el fundus de estómago de rata *in vitro* y efectos bifásicos (aumento de la contracción seguido de inhibición) en yeyuno e ileon de rata *in vivo* (Béjar et al., 2000).

Los efectos espasmogénicos sobre fundus resultaron consistentes y reproducibles para ambos extractos. El etanólico, mantuvo dicha actividad, lo que indica que el compuesto activo es una molécula pequeña, soluble en agua; su espectro de absorción IR entre 3400 y 1629  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de grupos hidroxilo. El dializado, una vez extraído con hexano, mantuvo toda la actividad; la búsqueda de alcaloides (Mayer, Dragendroff) para ambos extractos dio resultados negativos. Todo ello sugiere que la actividad comprobada *in vitro* e *in vivo* es debida a una mezcla compleja de compuesto.

Los flavonoides y derivados piceólicos pueden influir en la motilidad intestinal con muy pocos efectos secundarios anticolinérgicos, mientras que diversos triterpenos pueden ser los responsables de la actividad antiinflamatoria.

#### **B.1.6.2 Actividad antimicrobiana**

En los últimos años se ha investigado la actividad antimicrobiana y protectora frente a diversas infecciones (hongos, bacterias, parásitos...) basándose en el uso tradicional de las diferentes partes de *B. crassifolia*. En Guatemala existe una alta incidencia de dermatofitosis, lo que hace que se utilicen diversas plantas medicinales presentes en su hábitat natural para el tratamiento de dichas afecciones. En un estudio preliminar para la validación científica del uso popular de varias de estas especies, se comprobó el efecto antidermatofítico del extracto acuoso de *B. crassifolia* frente a todos los patógenos estudiados: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* (Cáceres et al., 1991). La tintura de la corteza es activa frente a bacterias Gram negativo y Gram positivo como *Staphylococcus pyogenes*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatodidea* (Cáceres et al., 1991; Cáceres et al., 1993; Gupta, 1995).

Los extractos de acetato de etilo de tallos y raíz y el extracto etanólico de corteza, presentan una importante actividad antimicrobiana, dosis dependiente, frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Micrococcus luteus* (Martínez-Vázquez, 1999).

La enfermedad de Chagas, producida por las formas tripomastigote y epimastigote de *Tripanosoma cruzi*, es muy común en las áreas rurales de Guatemala. Los fármacos utilizados para su tratamiento son de difícil obtención en el país y presentan además numerosos efectos secundarios a nivel gástrico y neurológico. Por ello, las plantas medicinales utilizadas popularmente frente a las enfermedades por protozoos podrían representar un tratamiento alternativo a la enfermedad de Chagas. De los cuatro extractos de *B. crassifolia* ensayados (hexánico, etanólico, acuoso y

metanólico), el extracto etanólico de la hoja resulta activo frente a la forma tripomastigote de *T. cruzi*, aunque su potencia es bastante baja (Berger, 1998).

En cuanto a su actividad inhibidora de *Leishmania*, el extracto metanólico de corteza resultó ser más potente que el mismo tipo de extracto procedente de hojas, siendo positiva en ambos casos (Peraza-Sánchez, et al., 2007).

Los compuestos fenólicos como el ácido gálico y diversos flavonoides son antisépticos, antioxidantes e inmunomoduladores. Las proantocianidinas oligoméricas, abundantes en esta especie, pueden contribuir a los efectos antioxidante, antibacteriano, antiviral y antidiarreico. Este grupo de compuestos recibe una atención especial ya que sus unidades monómeras catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina muestran una potente actividad antioxidante y efecto anticancerígeno. Los dos primeros, además de la procianidina B, demostraron una importante protección de la membrana celular que resultó ser dosis-dependiente, inhibiendo la lisis de las células sanguíneas inducida por radicales libres (Heitzman et al., 2005). Puesto que las proantocianidinas oligoméricas presentan una baja biodisponibilidad, su mecanismo de acción parece ser local, reduciendo así su potencial toxicidad y efectos secundarios.

#### **B.1.6.3 Actividad antidiabética**

Los frutos de *B. crassifolia* se han utilizado como antidiabéticos en la medicina popular mexicana desde la época precolombina. La hiperglucemia induce estrés oxidativo y puede causar también daño celular hepático. Un trabajo publicado recientemente utilizando los extractos de frutos y semillas de *B. crassifolia* recolectados en México (Perez-Gutierrez et al., 2010) ha demostrado que ambos mejoran la actividad de los enzimas antioxidantes SOD, GSH, GSSG y CAT en ratas diabéticas; además, inhiben la formación de productos finales de la glicación resultantes de reacciones no enzimáticas de carbohidratos y lípidos oxidados, las cuales son dos de las características de la diabetes tipo II. Dicha inhibición es comparable con la obtenida con un estándar como la aminoguanidina. Los resultados obtenidos sugieren la prevención del estrés oxidativo, supresión del daño celular hepático e inhibición de la disfunción hepática inducida por la hiperglucemia crónica, lo cual demuestra su valor potencial como

agente antidiabético seguro. Su posible mecanismo de acción antihiper glucémico parece ser tanto pancreático como extrapancreático; este último puede ser debido a la sensibilización del receptor de insulina en el órgano diana o la inhibición de la actividad de la insulinas en hígado y riñón, habiéndose descartado el efecto modulador de la absorción de glucosa a nivel intestinal (Pérez-Gutiérrez et al., 2010).

#### **B.1.6.4 Actividad sobre el Sistema Nervioso Central**

Diversos trabajos llevados a cabo en ratas tratadas con extractos etanólicos de corteza y hojas de *B. crassifolia* habiendo mediante inyección intraperitoneal, demuestran una disminución dosis dependiente en la actividad motora, analgesia media, esoftalmos, ptosis parpebral reversible, palidez en las orejas, catalepsia e hipotermia (Béjar y Malone, 1993).

Los resultados preliminares obtenidos con el extracto de acetato de etilo de las hojas y el etanólico de la corteza procedentes de México, sobre el SNC, y sus propiedades hipotensoras (Béjar et al., 1993) se vieron confirmados en estudios posteriores realizados con muestras de *B. crassifolia* procedente de Guatemala. El extracto acuoso de la corteza produjo varios efectos en el comportamiento: disminución en la actividad motora y flacidez general, piloerección positiva y ptosis parpebral; así mismo, redujo las respuestas inducidas al sonido y al tacto. El extracto acuoso de las hojas produjo todos los efectos anteriores y además catalepsia (reversible mediante estímulos) y disminución del reflejo de enderezamiento, del reflejo flexor ipsilateral y del ritmo respiratorio (Morales Cifuentes et al., 2001). Ambos extractos redujeron la actividad motora espontánea inmediatamente después de la administración intraperitoneal. Estos efectos son propios de un agente depresor del SNC.

El test de Irwin realizado con las mismas muestras de hojas y corteza (extractos acuosos) produjeron variaciones significativas en el comportamiento, con signos de retroceso, hipotermia y ptosis parpebral (Morales Cifuentes et al., 2001). Estos resultados confirman el ya indicado efecto depresor significativo sobre el SNC.

La actividad de *B. crassifolia* a nivel del SNC podría ser debida, al menos en parte, a compuestos fenólicos como la catequina y la procianidina B2 (epicatequin

(4 $\beta$ →8) epicatequina), los cuales ejercen un efecto antidepresivo en animal de experimentación a través de la inhibición de la recaptación de monoaminas (serotonina, noradrenalina y dopamina) (Jensen et al., 2001; Rocha et al., 2007).

Los compuestos triterpénicos y flavónicos aislados (ursenaldehído, betulina, quercetina y derivados) presentan actividad serotoninérgica parcial; también se han encontrado compuestos antagonistas débiles en las hojas, como el flavonoide viperina y dos aminoácidos no protéicos: ácido pipecolínico y 5-hidroxipecólico.

Muy recientemente se ha comprobado la capacidad de la catequina para atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual refuerza la hipótesis de sus efectos biológicos a nivel central (Faria et al., 2010).

Respecto a la actividad sobre el SNC, los extractos hexánico y acetato de etilo de la corteza resultaron inactivos, mientras que el de acetato de etilo de hojas y el etanólico de corteza han demostrado poseer actividad depresora con propiedades hipotensoras.

Todo lo anteriormente expuesto demuestra el interés del estudio en profundidad del extracto de la corteza de *B. crassifolia* sobre el SNC, del cual sólo se han realizado ensayos preliminares con resultados positivos y prometedores a este nivel.

En la tabla 1 y 2 se recogen a modo de resumen los usos tradicionales y los ensayos de actividad farmacológica de *B. crassifolia*.

<b>Uso tradicional</b>	<b>Parte utilizada/ Extracto</b>	<b>Composición química</b>
Expulsión durante el parto, favorecedor del sangrado en mujeres, colitis crónica, mordedura de serpientes, resfriados. Disminución de la pérdida de dientes, veneno para pescar. Aumento de la resistencia.	Corteza/ Acuoso (decocción)	Compuestos fenólicos (flavonoides), triterpenos, esteroides
Febrífugo, inductor de sueño, antidiabético	Frutos/ Acuoso, fruto entero	Polifenoles
Tratamiento de la disentería	Semilla/ Acuoso	-
Dolor de dientes, vaginitis, diarrea, bronquitis, asma, antiinflamatorio, resfriados. Aumento de la resistência.	Hojas/ Acuoso, etanólico	Triterpenos, flavonoides, esteroides, catequinas

**Tabla 1:** Usos tradicionales de *Byrsonima. crassifolia* (L.) H.B.K.

<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Parte utilizada/ Extracto</b>	<b>Composición química</b>
Antiinflamatorio/ Espasmogénico	Corteza, Hojas / Acuoso, Metanólico	Flavonoides, triterpenos
Antimicrobiano/Antifúngico/ Inhibidor de Tripanosoma/ Inhibidor de Leishmania	Corteza, Hojas / Acuoso, Metanólico	Compuestos fenólicos (ácido gálico, flavonoides, proantocianidinas)
Antidiabético	Frutos	-
Depresor SNC	Corteza, Hojas / Etanólico, Acetato de etilo	Compuestos fenólicos (catequina, procianidina B2), triterpenos

**Tabla 2:** Actividad farmacológica de *Byrsonima. crassifolia* (L.) H.B.K.

## B.2 METODOS DE ESTUDIO FARMACOLÓGICO

### B.2.1 Métodos de Estudio

La identificación de nuevos principios activos (de origen natural o sintético) o la búsqueda de nuevos efectos farmacológicos en sustancias ya conocidas, requiere de la realización de un número importante, variado y complejo de pruebas. Este laborioso proceso de desarrollo de un nuevo fármaco comprende tres fases fundamentales:

1º Ensayo preclínico o screening farmacológico realizado en animal de experimentación, en modelos *in vitro* e *in vivo*, el cual permite conocer las propiedades farmacológicas más relevantes, así como datos de farmacocinética y toxicidad.

2º Estudio de la relación estructura / actividad.

3º Ensayo clínico en humanos en sus distintas fases (I a IV), que permitirá valorar la eficacia y seguridad del compuesto en estudio, una vez que se haya concluido que el tratamiento puede ser beneficioso para el paciente.

De acuerdo con Turner (Turner, 1965) "el screening de nuevas sustancias con un posible valor farmacológico implica examen atento y evaluación". El screening se orienta a seleccionar aquellas técnicas más convenientes para detectar alguna actividad farmacológica, lo cual no debe de estar reñido con unas pruebas lo más sencillas posible, pues de esta forma se permite y facilita el análisis del mayor número de compuestos. Después de esta primera fase, habrá que realizar otras técnicas más selectivas y complejas para confirmar y ampliar los resultados obtenidos o dar posibles interpretaciones a su mecanismo de acción.

Se han descrito tres tipos de screening que permiten poner de manifiesto los objetivos de estos ensayos:

1º **Screening simple.** Consiste en utilizar uno o dos ensayos para encontrar sustancias que tengan una determinada actividad.

**2° Screening ciego.** Su principal propósito es demostrar si un nuevo grupo de sustancias es merecedor de un estudio más profundo, indicando cuál de entre ellas presenta las propiedades farmacológicas más interesantes.

Irwin (1962) señaló que gran parte del trabajo desarrollado hoy en día en los laboratorios puede ser predicho a través de una serie de juicios y actitudes. El screening es esencialmente un procedimiento que permite distinguir los fármacos útiles de los inútiles de la forma más rápida, comprensiva y económica posible. Los objetivos prioritarios de este programa de investigación influyen en la elección e interpretación del método por parte del investigador.

**3° Screening programado.** La búsqueda de un tipo específico de fármaco o la evaluación de uno o varios efectos farmacológicos determinados requiere la realización de una batería de tests; el propósito de este ensayo es más limitado que el del screening ciego, aunque proporciona mayor precisión en los resultados.

Los primeros ensayos con nuevas sustancias se realizan en diferentes especies de animal de experimentación, tanto *in vivo* como *in vitro*, con el fin de poner de manifiesto tanto la posible toxicidad como la acción farmacológica de nuevos productos y su posible utilidad desde el punto de vista terapéutico. Los resultados obtenidos sirven como primera aproximación y son fundamentales dentro del campo de investigación de nuevos fármacos con aplicación en terapéutica, aunque se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser del todo extrapolables del animal al hombre; sin embargo, son fundamentales como punto de partida para una posible realización de ensayos clínicos en sus diferentes fases, ya que un ensayo clínico se inicia cuando surgen resultados positivos en los estudios preclínicos. No obstante hay que tener en cuenta que frecuentemente se descubren en investigaciones preclínicas posibilidades terapéuticas que no tienen ningún beneficio en un ensayo clínico.



### **B.2.2 Métodos para el estudio de la actividad sobre el SNC**

El estudio del efecto de nuevos compuestos de origen vegetal sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) resulta de gran interés, si se tiene en cuenta que muchos de los fármacos utilizados actualmente en la terapéutica humana son compuestos derivados de extractos de plantas.

El SNC es la unidad anatómica y funcional que permite la relación del individuo consigo mismo y con su entorno, proporcionando el control consciente e inconsciente sobre todas las actividades y funciones del organismo. Su unidad funcional es la neurona. Las enfermedades del SNC se relacionan con lesiones bioquímicas en áreas específicas del cerebro o con anomalías en las funciones de transmisión, síntesis o liberación de neurotransmisores. Atendiendo a su actividad farmacológica, los fármacos que actúan sobre el SNC pueden clasificarse de forma general en: estimulantes, depresores y alucinógenos. En todos los grupos se encuentran sustancias activas de origen vegetal.

Tal y como se ha expuesto para los métodos de estudio farmacológicos de nuevas sustancias, los métodos de estudio sobre el SNC se realizan en primer lugar en animal de experimentación (Farmacología Experimental) y, posteriormente en el hombre (Farmacología Clínica).

La farmacología experimental implica una serie de test en animales, denominados ensayos farmacológicos, que están orientados a establecer el tipo de actividad que caracteriza al compuesto o compuestos en estudio.

En el caso de las sustancias con actividad sedante, no existe un criterio único que permita esta clasificación, siendo necesaria una verdadera “batería” de métodos de estudio que demuestren una serie de efectos o perfil de acción. Aunque la descripción completa de dichos ensayos se incluye posteriormente en el apartado Material y Métodos, se expone a continuación un breve resumen de los principales ensayos aplicados.

## 1. Estudio de comportamiento

La depresión del SNC se caracteriza por la pérdida de la sensibilidad y de la conciencia, así como de la actividad refleja y de la motilidad.

Se debe diferenciar:

- Bloqueo sensitivo: ausencia de toda sensibilidad, en especial la dolorosa.
- Bloqueo mental: pérdida de la conciencia y de todos los estados psíquicos perniciosos como el miedo, la ansiedad y la angustia.
- Bloqueo motor: pérdida de los movimientos y relajación muscular (pérdida del tono).
- Bloqueo de los reflejos: aparece espasmo laríngeo, broncoconstricción, vasoconstricción y bradicardia.

La observación simple sirve de orientación después de la administración del compuesto al animal de experimentación escogido (rata, ratón, gato, perro, mono), el cual puede mostrar excitación psicomotora, temblor, estado de furia o bien depresión psicomotora, con estado de quietud, indiferencia, hipotermia, sueño, relajación muscular. Se trata de un método puramente cualitativo (Irwin, 1962) que permite apreciar una idea general del tipo de actividad farmacológica que presenta el compuesto en estudio.

La pasividad de la respuesta del animal al ser colocado en una posición infrecuente puede indicar depresión central, miorelajación, parálisis o anestesia. Para valorar la respuesta a un determinado compuesto, se coge al ratón por la piel del cuello con los dedos índice y pulgar cuando el animal se encuentra en posición de andar y se valoran los movimientos que efectúa para escapar.

## 2. Estudio neurológico

Las acciones sobre el SNC como hipotermia, sedación, relajación muscular e incoordinación motora, pueden enmascarar efectos centrales específicos de los compuestos, razón por la cual se deben realizar algunas pruebas más generales como complemento a la evaluación de efectos específicos en el SNC. Se debe tener en cuenta

la necesidad de utilizar drogas patrón adecuadas para cada actividad evaluada, con el fin de tener un referente para su posterior comparación.

### 2.1 Motilidad

Un cambio negativo en la actividad motora pone de manifiesto actividad miorelajante, bloqueo neuromuscular y depresión central.

La motilidad espontánea de los animales se registra mediante aparatos denominados actímetros. Dichos aparatos poseen células fotoeléctricas que se activan cuando el animal se mueve dentro de la jaula; los movimientos se registran a través de células fotoeléctricas de gran sensibilidad (Boisser y Simon, 1967). Este método se ha utilizado, por ejemplo, para determinar las propiedades sedantes de la linarina, flavonoide aislado de *Valeriana officinalis* (Fernández et al., 2004).

Se ha demostrado que la combinación del test de curiosidad ("hole-board") con otro ensayo como el laberinto en cruz elevado, método validado para evaluar la ansiedad experimental, permite medidas independientes de la locomoción, exploración y ansiedad en animales de laboratorio (Steenbergen et al., 1991). Para comprobar el tipo de marcha de los animales, se impregnan sus patas con una grasa o cera y se colocan sobre un papel de filtro, observándose las marcas impresas. En el caso de producirse ataxia, dichas marcas son irregulares.

La prueba de la tracción se desarrolla colocando a un ratón sobre sus patas anteriores y sobre una cuerda horizontal; el animal en estado normal coloca también sus patas posteriores. Las drogas depresoras alteran este comportamiento (Irwin, 1968).

Para determinar la actividad de los compuestos sobre la coordinación motora de los animales de experimentación se utiliza la técnica denominada Prueba del cilindro giratorio ("rota-rod"), la cual evalúa los posibles trastornos que se producen como consecuencia de la administración de compuestos depresores del SNC (Fujimori and Cobb, 1965). Mediante este ensayo se ha puesto de manifiesto la actividad tranquilizante de numerosas especies vegetales, entre ellas el extracto de hoja de *N. Arbor tristis* (Saxena et al., 2002).

Otra técnica utilizada para evaluar el efecto de diversas drogas sobre la coordinación motora es el Test de la Chimenea, descrito por Irwin en 1964 y aplicado en numerosos trabajos (Dorr et al., 1971; Pérez et al., 1998).

Los tranquilizantes mayores tienen la propiedad de producir un estado de catatonía o catalepsia caracterizado por la permanencia del animal en posturas anormales y aún grotescas, lo que se debe a una acción sobre el sistema extrapiramidal. La clorpromacina es un fármaco inductor de catalepsia en animal de experimentación que se utiliza como patrón depresor del SNC con el cual se puede comparar la actividad de diferentes alcaloides como la esparteina (Pothier et al., 1998).

## **2.2 Sedación**

Las drogas hipnóticas son aquellas que producen sueño, mientras que las sedantes calman las hiperexcitabilidad nerviosa. Muchos fármacos producen las dos acciones, dependiendo de la dosis empleada.

Una droga hipnótica induce un sueño semejante al natural o fisiológico, es decir, un estado de inconsciencia reversible por estímulos sensitivos o sensoriales. Los barbitúricos son hipnóticos que producen una depresión no selectiva del SNC; por ello, en los animales de experimentación puede observarse una disminución de la actividad motora y pérdida de los reflejos posturales (Saxena et al., 2002), disminuyendo la respiración en su frecuencia y amplitud, incluso a dosis bajas. La latencia (tiempo de inducción del sueño) y la duración (tiempo de recuperación) de la pérdida del reflejo postural (reflejo de enderezamiento) de los animales después de la inyección del barbitúrico, deberán ser registradas y comparadas con drogas depresoras del SNC; éstas producen una reducción de la latencia y aumentan la duración del sueño inducido.

La capacidad de los barbitúricos para potenciar el efecto hipnótico de los fármacos ha sido utilizada para determinar la actividad neurofarmacológica de diferentes especies o extractos vegetales, entre ellos el fruto de *Solanum nigrum* (Perez et al., 1998) y *Cistus populifolius* (De Andrés et al., 1999), observándose en este último una marcada inducción al sueño y aumento de la duración del mismo.

### ***2.3 Aprendizaje y memoria***

La capacidad de aprendizaje del ser humano va unida a la función de la memoria de captar, sintetizar y almacenar los datos que le llegan.

### ***2.4 Convulsiones***

Con el nombre de drogas antiepilépticas o anticonvulsivantes se designan aquellos depresores centrales que tienen la propiedad de suprimir selectivamente las crisis de la epilepsia en sus diversas formas, impidiendo su aparición. El descubrimiento de nuevos compuestos eficaces y con menor toxicidad o efectos secundarios es un objetivo actual (Hiller y Zetler 1996; Pérez et al., 1998).

Teniendo en cuenta que todo acceso epiléptico depende de la existencia de un foco patológico que produce descargas anormales, la actividad anticonvulsivante de algunos compuestos puede ser estudiada mediante dos modelos experimentales:

- Convulsión inducida por pentilenotetrazol.
- Electroshock. Esta técnica pretende reproducir un acceso epiléptico semejante al humano. Las drogas antiepilépticas elevarían el umbral para la aparición de dicha crisis. Esta técnica consiste en implantar electrodos permanentes en el cerebro de ratas que recibirán descargas eléctricas al presionar una palanca. Las ratas reciben satisfacción al estimularse ciertas zonas cerebrales como el hipotálamo, ya que puede llegarse a varios miles de excitaciones por hora. Las drogas alteran la velocidad de esas estimulaciones en distintas zonas del cerebro.

## **B.3 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Frutas como las uvas, manzanas o peras contienen hasta 200-300 mg de polifenoles por 100 g de fruta fresca. Los productos elaborados a partir de estas frutas también contienen polifenoles en cantidades significativas.

Los polifenoles incluyen un grupo de estructuras químicas que se caracterizan por presentar el núcleo aromático de benceno, clasificadas según el número de anillos de fenol que contengan y los elementos estructurales que actúen como sustituyentes. En general, los fenoles vegetales presentan estructuras complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera y pigmentos de flores y frutos.

### **B.3.1 Origen**

Los polifenoles son productos secundarios del metabolismo de las plantas y generalmente participan en mecanismos de defensa frente a la radiación ultravioleta o agresión de agentes patógenos. En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al amargor, astringencia, color, aroma, olor y estabilidad oxidativa. Se encuentran ampliamente distribuidos, habiéndose identificado más de 8000 estructuras químicas en varias especies vegetales (Pandey y Rizvi, 2009).

Todos los compuestos fenólicos derivan de un intermediario común, la fenilalanina, o de un precursor cercano, el ácido shikímico. En un principio se encuentran en forma conjugada, pudiendo llevar uno o más residuos azucarados unidos a los grupos hidroxilo, aunque también aparecen uniones directas del azúcar a un carbono aromático.

Así, en la formación de polifenoles participan dos rutas metabólicas (Formica y Regelson, 1995)

1. Vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores.
2. Vía del ácido sikímico, dependiente de luz; se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa 4-P y el fosfoenolpiruvato (PEP). Mediante diversas modificaciones se obtiene el ácido sikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales.
3. Esta vía del ácido sikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaroil CoA, precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

Ambas rutas metabólicas derivan del metabolismo de la glucosa. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos discurre de un modo similar a la de los ácidos grasos; sobre una molécula de acetil CoA se van adicionando sucesivamente unidades de malonilCoA, con pérdida de un átomo de carbono, de modo que por cada malonil utilizado se integran dos átomos de carbono.

Los enzimas que participan se hallan asociados, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos policétidos íntegramente formados. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno, son muy inestables y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

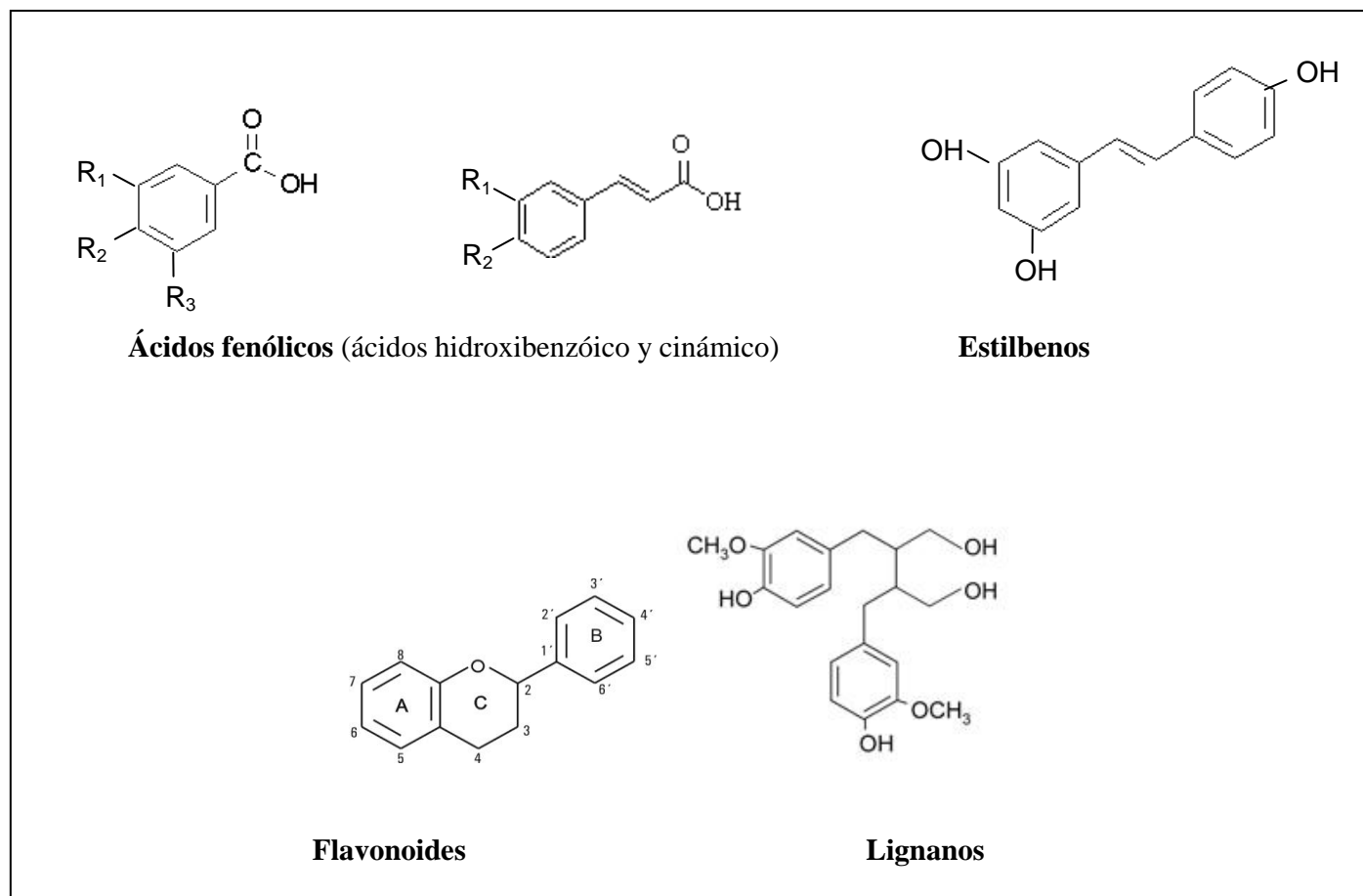
### B.3.2 Clasificación

Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contengan y de sus sustituyentes. Así, pueden ser divididos en más de 10 clases diferentes (Wollgast and Anklam, 2000), aunque los principales grupos corresponden a ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Pandey and Rizvi, 2009) (Tabla 3) (Figura 1).

Clase	Esqueleto Básico
Fenoles simples	$C_6$
Benzoquinonas	$C_6$
Ácidos fenólicos	$C_6-C_1$
Acetofenonas	$C_6-C_2$
Ácidos hidrocinámicos	$C_6-C_3$
Fenilpropanos	$C_6-C_3$
Cumarinas, isocumarinas	$C_6-C_3$
Cromonas	$C_6-C_3$
Naftoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides	$C_6-C_2-C_6$
Lignanos, neolignanos	$(C_6-C_3)_2$
Lignanos	$(C_6-C_3)_n$

**Tabla 3:** Principales grupos de polifenoles (Pandey and Rizvi, 2009)





**Figura 1:** Estructura química de los principales grupos de polifenoles

Los fenoles se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico; así, podemos encontrar compuestos de tipo C6-C1 derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables.

De menor significación son los compuestos de tipo C6-C2, derivados del ácido fenilacético, como el ácido homogentísico. El grupo de fenoles simples más extenso es el C6-C3 que constituye los derivados de cinamoilo. Estos compuestos, junto con los de tipo C6-C1 y C6-C2, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales. Dentro del grupo

C6-C3 se encuentran también las cumarinas compuestos bicíclicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes.

La distribución de los polifenoles en el vegetal a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme. Los compuestos insolubles se localizan en las paredes celulares, mientras que los polifenoles solubles se acumulan en las vacuolas. Algunos de ellos, como la quercetina, se encuentran en las plantas y en los productos derivados de las mismas como zumos, infusiones, vino etc. mientras que las flavanonas y las isoflavonas se encuentran más restringidas. En la mayoría de los casos, los vegetales contienen mezclas complejas de polifenoles. Las capas más superficiales de las plantas contienen mayor cantidad de estos compuestos que las capas más internas.

Existen numerosos factores que afectan al contenido en polifenoles de los vegetales, como el grado de maduración en el momento de la cosecha y factores medioambientales y edáficos (exposición solar, pluviometría...), de procesado y almacenamiento. En general, se ha observado que el contenido en ácidos fenólicos disminuye durante la maduración, mientras que aumenta la concentración de antocianos (Pandey and Rizvi, 2009).

### **B.3.3 Métodos de extracción**

Los polifenoles son compuestos relativamente estables que se pueden extraer a partir de planta seca y pulverizada con diferentes disolventes, tanto en frío como en caliente.

La extracción de polifenoles se realiza utilizando una mezcla de 70-80 % de Agua:Metanol o 70% de Agua:Acetona. También se utilizan mezclas de agua y etanol, aunque así sólo se extraen parcialmente, debido a la presencia de polímeros de alto peso molecular (por ejemplo, las procianidinas) (Grayer, 1989; Lee and Widmer, 1996).

Existen gran variedad de métodos para el aislamiento y fraccionamiento de polifenoles. Normalmente, la separación a partir de soluciones extractivas se consigue mediante precipitación por adición de un solvente orgánico miscible, como etanol o acetona.

La eliminación de impurezas de bajo peso molecular puede realizarse por diálisis, cromatografía de intercambio iónico (CII) o cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC). Estas técnicas se emplean para la separación de polifenoles y la eliminación de otros complejos macromoleculares.

La cromatografía de exclusión por tamaño molecular es la técnica ideal para separar moléculas de acuerdo a su tamaño molecular. De hecho, la separación se realiza en función de la masa molecular. El comportamiento de un polifenol muy ramificado difiere en gran medida del que pueda tener un polifenol de estructura lineal. Generalmente los polifenoles de estructura lineal eluyen antes que los ramificados.

La metodología a seguir para la identificación de los diferentes polifenoles de una muestra debería seguir el siguiente esquema (Markham and Bloor, 1998):

- Screening inicial para poner de manifiesto la presencia de los polifenoles en la muestra en estudio: cromatografía en capa fina (CCF)
- Aislamiento de dichos polifenoles de la planta en estudio mediante métodos analíticos adecuados: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), CCF.
- Determinación de la concentración de los polifenoles previamente aislados.
- Purificación de los mismos.

### **B.3.4 Métodos de aislamiento y purificación**

#### **B.3.4.1 Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (CCF) es utilizada como una técnica analítica de primera elección para la detección de diferentes grupos de principios activos, incluidos los polifenoles.

En la CCF, la fase estacionaria (FE) es un material poroso pulverulento extendido sobre un soporte de vidrio, plástico o metal, por el que fluye la fase móvil. Son de gran utilidad los cromatofolios facilitados en el mercado, que consisten en láminas de aluminio o plástico sobre las que está adherido el soporte adsorbente.

La selección de la fase móvil (FM) depende de las características de los compuestos a separar. Las geninas en general son solubles en disolventes apolares como hexano y diclorometano y por tanto, se desarrollan en las fases móviles de menor polaridad. Los heterósidos, por el contrario, son solubles en agua y en alcohol, por lo que se desarrollan con las fases móviles polares.

#### **B.3.4.2 Cromatografía líquida de alta eficacia**

La cromatografía líquida de alta eficacia o alta resolución (HPLC) se puede aplicar al estudio de polifenoles y otros compuestos de extractos vegetales con diferentes fines: preparativo, semipreparativo y analítico, lo que permite identificar y cuantificar los compuestos presentes e aislar los componentes de la muestra o purificarla en el contenido de un determinado compuesto,

##### **1. Fase estacionaria**

Para llevar a cabo la separación de polifenoles se utilizan preferentemente columnas de fase reversa C18 (octadecilsilano).

En el estudio de polifenoles es importante el tamaño de partícula utilizado en el empaquetado, ya que influye de manera relevante en una buena separación y aislamiento. En la bibliografía consultada la mayoría de los autores recomiendan un tamaño de partícula entre 3 y 10  $\mu\text{m}$  (Grayer, 1989; Mc Murrough y Byrne, 1992; Lee y Widmer, 1996; Markham y Bloor, 1998).

##### **2. Fase móvil**

Las fases móviles más utilizadas para el análisis de polifenoles están compuestas por agua, acetonitrilo y ácidos acético, fórmico y fosfórico con metanol. La proporción de los disolventes y el tiempo de análisis pueden variar según la composición y

complejidad de la muestra en estudio (Grayer, 1989; Lee y Widmer, 1996; Markham y Bloor, 1998).

La naturaleza de los disolventes y sus características pueden modificar la separación de los compuestos fenólicos. El acetonitrilo es comúnmente utilizado por obtenerse cromatogramas con una resolución de los picos mucho mayor que con metanol. Asimismo la sustitución del metanol por tetrahidrofurano ha conseguido mejorar la resolución de los cromatogramas (Lee and Widmer, 1996).

Otros factores del sistema cromatográfico como son el pH y el grado de ionización influyen en la retención de los polifenoles. Por ello, algunos autores utilizan ácido acético (2-5%), fosfórico o trifluoracético (TFA) en pequeña proporción, lo que disminuye el grado de ionización y mejora la resolución de los picos.

### **3. Detección**

La identificación de compuestos fenólicos se realiza por comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción obtenidos a diferentes longitudes de onda con compuestos patrón.

La cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector ultravioleta/visible (UV/VIS) es una técnica comúnmente utilizada para la identificación y cuantificación de polifenoles (Wollgast y Anklam, 2000). En los diferentes cromatogramas se observan los componentes que absorben a la longitud de onda establecida y el área del pico de cada componente. Para realizar la cuantificación de los diferentes compuestos, es necesario el análisis previo de patrones de los mismos (internos o externos), con los cuales comparar las áreas de los picos obtenidos (Markham y Bloor, 1998).

Diversos estudios ponen de manifiesto las ventajas de los detectores de fotodiodos array (PDA), ya que permite la comparación de los espectros de absorción de los picos a diferentes longitudes de onda, obteniéndose incluso imágenes tridimensionales (Wollgast y Anklam, 2000).

### B.3.5 Propiedades de los polifenoles

Numerosos polifenoles, especialmente los ácidos fenólicos, se encuentran directamente relacionados con la respuesta del vegetal a diferentes tipos de estrés: contribuyen a la curación por lignificación de las zonas dañadas, poseen propiedades antimicrobianas y su concentración aumenta después de la infección (Pandey and Rizvi, 2009).

Además de su función en el vegetal, muchos polifenoles presentan propiedades beneficiosas para la salud humana y por ello se han utilizado desde la antigüedad diferentes especies vegetales ricas en estos principios activos para el tratamiento de diversas afecciones.

La actividad antioxidante de los polifenoles es hoy en día ampliamente conocida; inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno, cuya acumulación ejerce un efecto negativo en diferentes órganos y sistemas. Presentan una actividad quelante de metales y de oxígeno y favorecen la supervivencia celular (Bravo, 1998; Rice-Evans, 1995; Bastianetto, 2002; Scalbert et al, 2005). (Catapano, 1997; Hagerman, et al., 1998; Cook and Samman, 1996; Vinson, 1998).

Las propiedades químicas de los polifenoles con respecto a su capacidad para donar hidrógenos como eliminadores de radicales libres son las que definen su actividad antioxidante. Los grupos fenólicos de los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxi relativamente estables, interrumpiendo así las reacciones de oxidación en cadena de los componentes celulares.

Se deben cumplir dos condiciones para que los polifenoles puedan ser considerados antioxidantes (Rice-Evans, 1995):

- Que al encontrarse en bajas concentraciones con respecto al sustrato que va a ser oxidado, puedan provocar un retraso o prevenir una autooxidación o una oxidación por medio de radicales libres.

- Que el radical resultante deba ser estable, ya que los polifenoles pueden estabilizar por medio de uniones de hidrógeno o por sucesivas oxidaciones.

Además, para que los polifenoles puedan considerarse eliminadores efectivos de radicales libres deben cumplir alguno de los tres criterios siguientes (Rice-Evans, 1995):

- Existencia de la estructura O-dihidroxi del anillo B que confiere una gran estabilidad a las formas radicales y que participa en los procesos de deslocalización de electrones.
- El doble enlace 2,3 debe estar conjugado con la función 4-oxo del anillo C, ya que esta configuración es responsable de la deslocalización del anillo B.
- Presencia de los grupos hidroxilo en 3 y 5 de la función 4-oxo en los anillos A y C, ya que confieren una gran capacidad de eliminación de radicales.

Está demostrado que un aporte de polifenoles incrementa la capacidad antioxidante plasmática. Este aumento puede explicarse por la presencia de polifenoles reductores y sus metabolitos en plasma, por sus efectos sobre la concentración de otros agentes reductores (efectos moderados sobre antioxidantes endógenos), o por su efecto sobre la absorción de compuestos prooxidantes como el hierro. Recientemente se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos existentes en el vegetal y su actividad captadora de radicales libres (Mustafa et al., 2010).

Los polifenoles, debido a su efecto antioxidante, pueden proteger a los componentes celulares frente al daño oxidativo y, por tanto, limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (Pandey and Rizvi, 2009). Así, han demostrado un amplio rango de actividades farmacológicas como anticancerígenos, antivirales, antimicrobianos, antitrombóticos (Konneh and Caen, 1998), antiinflamatorios y antimutagénicos (Agarwal and Mukhtar, 1996; Kuo, 1996; Newmark, 1996; Williamson, et al., 1996; Fotsis et al., 1997; Suschetet et al., 1998; Mustafa et al, 2010).

Los polifenoles poseen propiedades antialérgicas (Benavente-Garcia, et al., 1997) y pueden actuar modulando reacciones inmunes, así como las acciones de los enzimas topoisomerasa II DNA (Romanczyk et al., 1997), tirosina kinasa (Groundwater et al., 1996), citocromo P-450 (Huang and Ferraro, 1992), óxido nítrico sintasa (Romanczyk et al., 1997), ciclooxigenasa y lipoxigenasa (Cook and Samman, 1996; Romanczyk et al., 1997).



## **C. PARTE EXPERIMENTAL**

## C.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La especie objeto de estudio fue incluida dentro del Proyecto CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) y facilitada por el grupo investigador de la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dirigido por el Dr. D. Armando Cáceres.

### C.1.1 Material de origen vegetal

#### C.1.1.1 Recolección

La corteza de *B. crassifolia* fue recolectada en su habitat de crecimiento silvestre (Samayac, Suchitepéquez) y autenticada por la Dra. Elfriede de Pöll (Herbario de la Universidad de Valley) Se encuentra un ejemplar depositado en el Herbario del Laboratorio Farmaya con n° de herbario 369 (Guatemala, Guatemala).

#### C.1.1.2 Dsecación

Para evitar cualquier tipo de alteración que pudiera afectar a la composición de la planta, inmediatamente después de recolectarla, fué desecada en una habitación suficientemente aireada, alejada de la incidencia directa de los rayos solares y a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

#### C.1.1.3 Pulverización y Almacenamiento

Como paso previo para la obtención de los extractos la corteza de *B. crassifolia* fue pulverizada en molino, hasta alcanzar un tamaño de partícula adecuado, cuidando que las partículas no quedaran demasiado pequeñas, ya que podrían perjudicar los procesos de extracción por la formación de barro. Posteriormente se almacenó en frascos de color topacio y en cajas de plástico convenientemente cerradas y etiquetadas en lugar seco, preservándola de la luz y humedad.

### **C.1.2 Material de origen animal**

Para los ensayos farmacológicos se emplearon como animales de experimentación ratones macho no cosanguíneos, variedad albina, cepa CD/1 Swiss procedentes de Charles River (CRIFFA, Barcelona, España).

Los animales se mantuvieron en el Estabulario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM, en grupos de siete por jaula con una temperatura ambiente de 22 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionó comida y agua *ad libitum* (dieta estándar, *Interfauna, Barcelona, España*).

En todos los casos pasaron un período de al menos cuatro días antes de su utilización y en el momento de la experimentación tenían un peso comprendido entre los  $23 \pm 2$  gramos.

En el estabulado y utilización de los animales se siguió la normativa vigente de la Unión Europea sobre el uso y experimentación con animales de laboratorio (*Council Directive 86/609/EEC*)

## **C.2 ESTUDIO MICROGRÁFICO DE LA DROGA**

Las drogas vegetales tienen una serie de elementos, apreciables al observar la droga pulverizada al microscopio. Muchos de estos elementos son propios y característicos de cada droga, lo cual permite identificar la misma y también detectar posibles adulteraciones y falsificaciones.

El estudio micrográfico de la especie se realizó sobre la corteza previamente pulverizada y tamizada, utilizando los reactivos de aclarado y tinción apropiados para la identificación de las estructuras presentes en la muestra. Mediante el análisis microscópico de la droga pulverizada se ponen de manifiesto tanto los contenidos como los elementos celulares que permiten su identificación. Para la realización del estudio se utilizó un microscopio Olympus CH30RF200.

### **C.2.1 Montaje de las preparaciones**

Una vez preparada la muestra, se colocó una mínima cantidad en un portaobjetos para posteriormente ser tratada con unas gotas de los diferentes reactivos, dejando actuar el tiempo suficiente para su observación a través del microscopio. Se finaliza la preparación colocando un cubreobjetos de cristal para fijar la muestra. La observación llevo a cabo con aumentos de 10x y 40x.

En primer lugar se observa la muestra con agua, a continuación con hidrato de cloral como agente clarificante y por último con tres reactivos específicos de tinción: agua de yodo, floroglucina clorhídrica y sudan III, que permiten poner de manifiesto la fécula, lignina y componentes lipófilos, respectivamente.

## **C.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN**

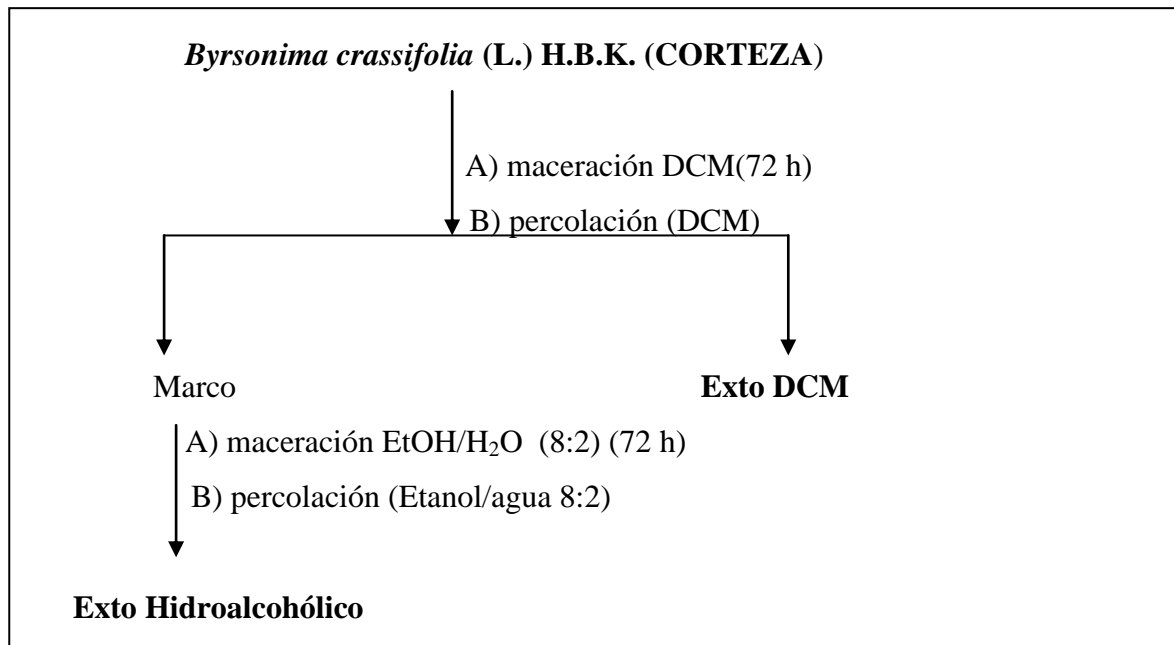
Se siguió el método establecido por el Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

La obtención de los extractos se realizó siguiendo el método de extracción por polaridad creciente, sometiendo la droga a maceración con posterior percolación.

Se inició el proceso extractivo con un disolvente apolar (diclorometano) a fin de obtener los compuestos de naturaleza lipófila. Para ello se mantuvo la muestra en maceración durante tres días consecutivos para una correcta extracción, controlando la temperatura y la humedad del ambiente que se mantuvieron constantes. Tras los días establecidos se realizó la percolación.

El marco obtenido se dejo secar durante dos días, para eliminar y evaporar el diclorometano. Posteriormente se realizó la extracción con un disolvente polar con el que conseguimos extraer compuestos de naturaleza hidrófila. Como disolvente polar se utilizó una mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O (8:2).

En la Figura 2 se observa el esquema de extracción que se ha seguido para la obtención de los extractos objeto del estudio.



**Figura 2 :** Esquema de extracción, utilizandose como disolventes DCM (Diclorometano) y EtOH/H<sub>2</sub>O (8:2)

## C.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El estudio fitoquímico de la droga se llevo a cabo realizando una serie de pruebas s fitoquímicas sencillas con el fin de conocer los posibles compuestos que pudieran encontrarse en la especie en estudio.

### C.4.1 Screening fitoquímico

Se realiza una infusión con el material vegetal para detectar lo compuestos hidrosolubles y se toman diferentes alícuotas con las cuales se realizan los ensayos fitoquímicos cualitativos, que permiten detectar la presencia de grupos de principios activos en las drogas. Suelen ser ensayos de coloración y/o precipitación.

#### Alcaloides

- Reactivo de Buchardart (I+IK), se forma un precipitado coloración rojo
- Reactivo de Mayer (Tetrayodomercuriato potásico), se forma un precipitado de un color blanquecino
- Reactivo de Dragendorff (Tetrayodobismutato potásico), se forma un precipitado pardo-rojizo

#### Flavonoides

- $\text{FeCl}_3$ , si existen flavonoides la coloración vira a verde
- KOH (2-3 gotas), oscureciéndose el filtrado.

#### Antraquinonas

- Reacción de Börntrager (2-3 gotas de NaOH): en presencia de antraquinonas libres y oxidadas se obtiene un color rojo cereza.

#### Heterósidos saponínicos

- Formación de espuma persistente por agitación
- Poder tensoactivo

#### Taninos.- podemos distinguir mediante $\text{FeCl}_3$ , 2-3 (gotas)

- Gálicos.- Con  $\text{FeCl}_3$  forma un precipitado azul oscuro o azul negruzco.
- Catéquicos o condensados.- Con  $\text{FeCl}_3$  forma un precipitado pardo-verdoso
- Reactivo de Stiasny (CIH + Formaldehído, 1:1) formará un precipitado en presencia de taninos condensados o no hidrolizables.

### C.4.2 Cromatografía en capa fina

La Cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica cromatográfica ampliamente utilizada para separar e identificar los constituyentes químicos en las muestras en estudio. Consiste en una técnica bastante sencilla y relativamente económica que requiere poca cantidad de muestra. La técnica de CCF fue utilizada para caracterizar los extractos obtenidos a partir de la droga vegetal.

La CCF se realiza normalmente en sentido ascendente en unos recipientes apropiados (cámaras de vidrio) en los que previamente se ha introducido la fase móvil, de tal modo que en su interior la atmósfera está saturada con vapores de la misma. Respecto a los valores de  $R_f$ , (relación con el frente o factor de retardo, que compara la distancia recorrida por la muestra con la distancia recorrida por el disolvente) a veces son poco reproducibles por lo que conviene introducir uno o más compuestos de referencia como marcadores.

### Procedimiento

**Fase estacionaria** Se utilizaron para el estudio **cromatofolios de silicagel**, por ser un material idóneo para la detección de un gran número de principios activos, mediante el uso de multitud de fases móviles.

**Fases móviles** La buena selección de adecuadas fases móviles es fundamental para que se produzca la migración y separación de los constituyentes, que nos permita su posterior identificación.

Las fases móviles utilizadas en el estudio preliminar fueron:

- Toluleno/Acetona (80:20)
- Acetato de Etilo/Metanol/Agua (100:13,5:10)
- Metanol/Agua (80/20)
- Tolueno/Cloroformo/Acetona (40:25:35)

- Acetato de Etilo/Etanol/Agua/Amoniaco (65:25:9:1)
- Acetato de Etilo/Metanol/Agua (77:15:8)

Lo que pretendemos conseguir con esta selección es el uso de un número reducido de fases móviles, que serán elegidas en función de la polaridad de los compuestos en estudio.

### **Detección**

La detección de los compuestos separados se realizó en primer lugar por observación al visible a la luz UV, detectando sustancias que absorben a longitud de *onda larga* (365 nm) y de *onda corta* (254 nm).

Existe una gran variedad de reveladores útiles para la identificación de las diferentes componentes que pueden encontrarse en una muestra problema. Se detallan a continuación los más utilizados.

#### a) Alcaloides:

Los alcaloides son sustancias nitrogenadas de carácter básico. Pueden presentarse en la naturaleza como: Sales de ácidos orgánicos (solubles en agua), en forma de bases libres (insolubles en agua) o unidos a taninos (parcialmente solubles en agua).

Su presencia se pone de manifiesto con reactivos específicos:

- Reactivo de Buchardart (I+IK), dando una coloración roja
- Reactivo de Mayer (Tetrayodomercuriato potásico), dando un color blanquecino
- Reactivo de Dragendorff (Tetrayodobismutato potásico), dando un color pardo-rojizo.

b) Flavonoides. Derivan del 2-fenilcromano; se encuentran en forma libre o formando heterósidos. La genina es soluble en alcohol y en disolventes orgánicos apolares, e insoluble en agua. Los heterósidos son solubles en agua y en alcohol.



- Reactivo de NEU (solución metanólica al 1 % de difenilborato de 2-aminoetilo), detecta la mayoría de los flavonoides.

c) Antraquinonas. En la naturaleza pueden aparecer en forma de heterósidos, geninas libres o en forma oxidada. Derivan de la antraquinona. Los heterósidos son solubles en agua y alcohol y las geninas en disolventes orgánicos apolares y en agua alcalina.

d) Heterósidos saponínicos. Son sustancias generalmente amorfas por su alto peso molecular. Poseen poder DETERGENTE al agitar (producen espuma persistente) y poder EMULGENTE (favorecen la formación de emulsiones). Son solubles en agua, alcohol metílico, alcohol etílico y acetona e insolubles en disolventes orgánicos no oxigenados.

Como reactivo revelador de las saponinas utilizamos Vainillina sulfúrica (consiste en dos disoluciones: una, 1% de vainillina en etanol que se mezcla a partes iguales con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 % en etanol a la hora de revelar).

d) Taninos. Se distinguen dos grupos de taninos diferentes por su estructura y por su origen biosintético: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los *taninos hidrolizables* son poliésteres de un azúcar, generalmente glucosa, o de un poliol y un número variable de ácidos fenólicos. Son hidrolizables por ácidos, álcalis y enzimas. Los *taninos condensados o proantocianidinas* son oligómeros y polímeros flavánicos. Los taninos se pueden detectar con sales férricas Cl<sub>3</sub> Fe.

e) Cardiotónicos. Los cardiotónicos son un grupo de productos naturales de naturaleza esteroídica, bien conocidos desde antiguo por su toxicidad cardíaca y que han adquirido un papel relevante en terapéutica desde la introducción de los digitálicos en la práctica médica por Withering en 1785. De los más de 300 aislados hasta la fecha, digoxina y digitoxina son los más utilizados para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de determinadas arritmias.

Se emplea como reactivo revelador: Liebermann-Buchard. Para preparar este reactivo añadimos 5 ml de anhídrido acético sobre 50 ml de etanol absoluto previamente enfriado en hielo y a continuación se adicionan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se

pulveriza la placa calentándola posteriormente durante 10 minutos a 100°C (aparecen coloraciones grisáceas).

#### f) Cumarinas

Son compuestos de naturaleza fenólica derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona y de estructura muy variada; a la luz u.v se observan coloraciones azul, amarillo o púrpura, colores que se exaltan en presencia de amoníaco. Por lo tanto para su detección se observan manchas al U.V. y en presencia de vapores de  $\text{NH}_3$ . Como revelador empleamos el reactivo de Bornträger (aparición de color que varía del rojo al violeta), al añadir KOH al 5%.

## C.5 PRUEBAS FARMACOLÓGICAS

Tras el estudio fitoquímico se llevo a cabo un estudio preliminar de la actividad farmacológica así como de la posible toxicidad, tanto de la especie en estudio como de los principales grupos de principios activos que contiene.

Los estudios preliminares realizados con anterioridad, que dieron lugar a la presentación de la tesina de licenciatura, pusieron de manifiesto la actividad de *B. crassifolia* esta especie a nivel del Sistema Nervioso Central. Se continuó, por tanto, con el estudio de su actividad en profundidad a nivel del SNC.

### C.5.1 Toxicidad

#### C.5.1.1 *In Vivo*: Cálculo de la $\text{DL}_{50}$

El cálculo de la dosis letal tiene como objetivo la determinación de la toxicidad aguda. De forma paralela al cálculo de la dosis letal  $\text{DL}_{50}$ , se realizó para cada extracto en estudio, el Test de Irwin a fin de establecer también el perfil de actividad de los mismos.

El cálculo de la  $\text{DL}_{50}$  se basa en el diseño de un modelo binario, según el método clásico de Reed y Muench (1938). Este método consiste en anotar el número de animales vivos y animales muertos para cada una de las dosis ensayadas. Se realiza el cálculo de las frecuencias acumuladas absolutas de vivos para las distintas dosis en el

sentido de dosis mayor a menor, ya que un animal superviviente a una dosis también sobreviviría a una dosis menor, y el cálculo acumulado de animales muertos en el sentido opuesto.

## Procedimiento

Se administraron, a lotes formados por 10 animales, dosis crecientes de los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de la corteza.

Dosis: Extracto diclorometánico: 1,2; 2; 5 y 10 g de planta seca/Kg de animal.

Extracto hidroalcohólico: 0,62; 0,93; 1,25; 2,5 g de planta seca/Kg de animal

Todas las administraciones se realizaron por vía intraperitoneal. El recuento de los animales se realizó a las 24 horas de la administración. El volumen de inyección en todas las experiencias fue de 0,2 ml. El vehículo utilizado fue cloruro sódico al 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub>

Para cada dosis se calcula la proporción de supervivencia como la frecuencia acumulada absoluta de vivos dividido por la suma de las frecuencias acumuladas absolutas de vivos y muertos.

### C.5.2 Test de Irwin

Es una prueba multidimensional (Irwin, 1962), que consiste en la observación de ratones, que nos permitan objetivar una serie de parámetros a distintos tiempos, a partir de la administración del producto en estudio. Como paso previo al estudio de la actividad de los extractos, se realizará el test con sustancias patrones, de actividad conocida.

**Fase de observación sin manipulación** Tras la administración de los compuestos en estudio o del vehículo se observa a los animales en las jaulas en las que se encuentran desde el día anterior a la prueba, con el fin de que el ambiente les sea conocido. Se observa si el animal está despierto, dormido o en estupor, si está quieto ó se mueve de forma inquieta, si demuestra temor, agresividad o indiferencia frente al experimentador y si está callado o emite ruidos.

Se anotan: posición del cuerpo, apertura palpebral, actividad locomotora, comportamiento anormal, respiración, temblores, sacudidas, convulsiones.

**Fase de observación con manipulación** Para este estudio al animal de experimentación se le somete a diversas pruebas para poner de manifiesto la actividad de la muestra en estudio a nivel central.

Consta de tres partes:

- estudio de comportamiento
- estudio neurológico
- esquema autónomo

## Procedimiento

Para estudiar los diferentes parámetros, se comparan los animales tratados con diferentes sustancias patrón de actividad conocida con un grupo control al que previamente se le ha administrado suero fisiológico. Como material se utilizaron ratones macho swiss, 6 ratones por cada lote. En la Tabla 4, se indican los patrones empleados con una acción farmacológica reconocida así como las dosis a que han sido administradas.

<b>SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO</b>	<b>Agonistas colinérgicos</b>	Carbacol , HCl (2 mg/kg)
	<b>Antagonistas colinérgicos</b>	Atropina, sulfato (2,5 mg/kg) Escopolamina, HBr (2 mg/kg)
	<b>Agonistas catecolaminérgicos</b>	Adrenalina, birttrato (1 mg/kg) Anfetamina, bitartrato (5 mg/kg) Metilfenidato, HCl (10 mg/kg)
	<b>Anestésicos locales</b>	Lidocaína (40 mg/kg)
<b>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>	<b>Analgésicos opioides</b>	Morfina, HCl (80 mg/kg)
	<b>Ansiolíticos y sedantes</b>	Pentobarbital sódico (40 mg/kg) Haloperidol (6 mg/kg)

**Tabla 4:** Patrones y dosis utilizadas de los mismos en el Test de Irwin

Dosis: Extracto diclorometánico: 1,2 mg/kg de peso de planta seca/kg de animal.

Extracto hidroalcohólico: 0,5 mg/kg de peso de planta seca / Kg de animal.

Las observaciones de los parámetros se realizaron a diferentes tiempos. Los efectos se miden dando como valor un n° entero dentro de la escala del 0 al 8, de modo que cuando la normalidad sea la ausencia de respuesta lo indicaremos con un 0 y si el efecto aparece habitualmente en condiciones normales se valora como 4, siendo posible detectar un aumento o disminución de la respuesta. Además, la asignación de una puntuación a la respuesta manifestada por un grupo se realiza mediante el cálculo del promedio entre las respuestas de sus componentes.

iempo (h)							
24h	6h	3h	1½	½h			
					ALERTA	Percepción Conciencia	ESTUDIO COMPORTAMIENTO
					ESTEREOTIPIA		
					PASIVIDAD		
					ASEO	Disposición de ánimo	
					INTRANQUILIDAD		
					IRRITABILIDAD, AGRESIÓN		
					ACTIVIDAD ESPONTÁNEA	Actividad motora	
					REACTIVIDAD		
					RESPUESTA AL TACTO		
					COLA DE STRAUB	Excitación del SNC	ESTUDIO NEUROLOGICO
					TEMBLORES		
					CONVULSIONES		
					VOLTERETA ENDEREZAMIENTO	Incoord. Motora	
					TONO DE EXTREMIDADES	Tono Muscular	
					APREHENSIÓN		
					TONO DEL CUERPO		
					TONO ABDOMINAL	Reflejos	
					REFLEJO PINEAL		
					REFLEJO CORNEAL		
					RIF(Reflejo ipsilateral flexor)		
					APERTURA PALPEBRAL		
					EXOFTALMOS		
					SALIVACIÓN		
					SIGNO DE RETROCESO		
					PILOERECCIÓN		
					HIPOTERMIA		
					RITMO RESPIRATORIO		

**Tabla 5:** Efectos sobre el Sistema Nervioso Central estudiados en el Test de Irwin

### **C.5.3 Estudios Neurofarmacológicos**

Tras la realización del test de Irwin, considerando los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los parámetros que han sufrido modificación tras la administración de los extractos de la planta en estudio, se consideró oportuno realizar un estudio completo sobre el SNC.

Para ello se seleccionaron una serie de test que permitieran poner de manifiesto y cuantificar las actividades detectadas mediante el Test de Irwin. Las pruebas seleccionadas para este estudio fueron las siguientes:

- 1° Test de la actividad motora espontánea
- 2° Test de la curiosidad
- 3° Test de temperatura rectal
- 4° Test de la coordinación motora
- 5° Test de inducción al sueño por pentobarbital sódico

### **Procedimiento**

Condiciones experimentales, que han sido:

Temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )

Humedad ambiental ( $60 \pm 5\%$ )

Luz artificial, siempre de la misma intensidad

Se emplearon ratones Swiss machos, de  $25 \pm 2$  g de peso, distribuidos en lotes de 7 animales. La administración se efectuó por vía intraperitoneal, siendo el volumen de inyección de 0,2 ml por ratón.

Dosis utilizadas:

Extracto diclorometánico: 1,25 g de planta seca/kg de peso

Extracto hidroalcohólico: 1/3 de la dosis letal<sub>50</sub> (0,5 g de planta seca /kg de animal).

El análisis de los resultados se ha realizado mediante el método ANOVA por una vía incluido en el programa Statgraphic versión 4.1. La significación estadística se encuentra reflejada en las tablas correspondientes.

#### **C.5.3.1 Test de la Actividad Motora Espontánea**

Esta prueba permite conocer si un determinado compuesto o principio activo actúa como estimulante o depresor del SNC. Se estudia la actividad de los extractos de *B. crassifolia* con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el test de Irwin.

#### **Procedimiento**

Se utilizó un actímetro PANLAB (modelo 0602), colocando los animales en dos cavidades conectadas a dos placas fotoeléctricas. Mediante un contador digital se registró automáticamente el número de movimientos que realizan los animales.

En una de las cajas se coloca el grupo al que hemos administrado suero fisiológico. En otra de las cajas se coloca el lote de ratones a los cuales se les ha administrado el extracto en estudio. Se realizan medidas cada diez minutos durante una hora. Se compara los movimientos de los animales a los cuales se les ha administrado la muestra frente a aquellos que solo han sido tratados con suero fisiológico.

#### **C.5.3.2 Test de la Curiosidad**

En los resultados obtenidos en el Test de Irwin se observó una disminución en la conducta exploratoria de los animales. Se consideró necesario la realización del test de la curiosidad para corroborar este efecto.



## **Procedimiento**

La medida de este parámetro se realiza según el método propuesto por Boissier y Simon (Boissier y Simon 1967) o "Test de la Planche a Tròus".

Para ello se dispone de un aparato, modelo PTR 16 CiBERTEC que consta de una plancha de plástico de 35 cm de lado y 5 cm de grosor, provista de 16 agujeros de 28 mm de diámetro, regularmente dispuestos, y provisto de paredes de plástico transparente, con el fin de que los animales de experimentación no puedan escapar.

Cada agujero está atravesado, a 12 mm por debajo de la parte superior de la plancha, por una célula fotoeléctrica. Todas las células fotoeléctricas están conectadas a un monitor que registrará los movimientos en un contador digital. Cada vez que el animal introduzca la cabeza en el agujero, el monitor contabilizará este movimiento.

Se deberán introducir los ratones en la plancha de uno en uno, ya que de otro modo el porcentaje de error sería significativo.

Se comienza la experiencia inyectando el extracto en estudio, suero fisiológico o sustancia patrón a cada animal, siendo a continuación introducido en el aparato, se anotarán cada cinco minutos y de forma acumulativa las veces que el animal introduce la cabeza en el agujero.

### **C.5.3.3 Test de la Temperatura Rectal**

Existen muchos compuestos que provocan una disminución de la temperatura corporal como consecuencia de su actividad a nivel central.

## **Procedimiento**

Para medir la temperatura rectal se ha utilizado un termómetro digital modelo PANLAB, que lleva acoplada una sonda que permite la medida de la temperatura, mediante la introducción de la misma a una profundidad de 2 cm en el recto del animal de experimentación.

Se inicia la experiencia tomando la temperatura a tiempo cero ( $t_0$ ) de cada animal, que servirá como medida control. A continuación, se procederá a la administración vía intraperitoneal del extracto en estudio y se tomarán medidas de la temperatura rectal a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración del mismo.

#### **C.5.3.4 Test de la Coordinación Motora**

La primera manifestación de la depresión del SNC en el ratón es la debilidad motora. Esta debilidad se detecta por la dificultad o fallo en el animal de experimentación para agarrarse a la superficie de un cilindro rotante (Turner, 1965).

### **Procedimiento**

Para evaluar este parámetro utilizamos la técnica descrita por Dunham (Dunham et al., 1957). El aparato que empleamos es el llamado Rota-Rod, modelo LI-8500, que consta de un cilindro que gira alrededor de un eje y en el cual podemos regular la velocidad de rotación. En nuestra experiencia aplicaremos una velocidad constante de 16 r.p.m.

Para mantener separados a los animales, el cilindro central se encuentra dividido por discos opacos. Cada una de las secciones formadas está provista de un contador que se pone en marcha al iniciar la prueba y se para de forma automática cuando el animal cae al cilindro central.

Comenzaremos la experiencia situando a los animales sobre el cilindro y anotando el tiempo que se mantienen caminando sobre él. Posteriormente se administra el producto, y se mide el tiempo que el animal es capaz de mantenerse sobre el cilindro giratorio, tomando valores a diferentes tiempos tras la administración ( $t_0$ ) y a los 30 ( $t_{30}$ ), 60 ( $t_{60}$ ), 90 ( $t_{90}$ ) y 120 ( $t_{120}$ ) minutos de la misma.

### C.5.3.5 Sueño inducido por Pentobarbital Sódico

Los barbitúricos son un grupo de fármacos con propiedades sedantes e hipnóticas. Todos ellos derivan del ácido barbitúrico, y deben su actividad a la presencia de grupos alquilo o arilo en la posición 5.

La acción de los barbitúricos puede ser reforzada por la acción de otros fármacos, dando lugar a un sinergismo de acción. Las sustancias potenciadoras del sueño inducido por barbitúricos son depresoras del SNC

En la realización del Test de Irwin se ha observado una actividad depresora del SNC de *B. crassifolia*, por lo que se ha considerado interesante estudiar su acción potenciadora de sueño.

## Procedimiento

Numerosas drogas deprimen el SNC y producen inconsciencia o sueño. Como norma general, los animales se tambalean inmediatamente; si se les administra una dosis determinada de un fármaco, el tiempo que tardan en dormir por sí mismos es el tiempo de sueño, e indica la duración de la acción de una dosis del fármaco.

En esta prueba se valorará el tiempo de sueño inducido por barbitúricos; para ello, transcurridos 30 minutos de la administración por vía intraperitoneal de los productos en estudio, se administra por la misma vía, 60 mg de pentobarbital sódico, anotándose a continuación para cada animal el tiempo de inducción al sueño ( $t_1$ ) y el tiempo de duración del mismo ( $t_0$ ).

## C.5.4 Otras Pruebas Farmacológicas Generales

Una vez comprobados de forma preliminar los efectos a nivel del SNC la corteza de *B. crassifolia*, nos propusimos investigar otras posibles actividades dado su amplio empleo popular.

Así pues, se decidió comprobar la actividad antiinflamatoria, ya que su utilización popular con esta finalidad aparece citada en la literatura, y también el posible efecto analgésico, bien pudiera relacionarse con una acción analgésica

### C.5.4.1 Actividad antiinflamatoria

El modelo de edema plantar por carragenina fue inicialmente descrito para ratas (Winter et al., 1962). Consiste en un método clásico y muy útil para el ensayo preliminar de productos naturales con posible actividad antiinflamatoria, pues se ha comprobado mediante el uso de inhibidores específicos que en su evolución están implicados la mayoría de los mediadores de la inflamación.

## Procedimiento

Se ha seguido el protocolo elaborado por el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para este modelo de inflamación, usando como patrón la indometacina, un AINE con alta actividad antiinflamatoria. Los dos extractos de *B. crassifolia* se disuelven en propilenglicol/glicerina/agua (4/1/5) para su administración.

Lote control: vehículo

Lote patrón: indometacina

Lotes problema: extractos de *B. crassifolia*

Se mide inicialmente el volumen plantar basal de la pata trasera izquierda hasta el maléolo lateral de todos los animales mediante un pletismómetro de agua (Letica LI 7500)

A continuación se administra por vía oral mediante sonda, el vehículo, indometacina o el extracto a cada lote respectivamente. Una hora después se procede a la inoculación de la carragenina (0,5 ml al 3% en suero fisiológico) mediante inyección subcutánea en la aponeurosis plantar de la pata izquierda de todos los animales. A las 3, 5, 7 y 24 horas de la inoculación se mide el volumen de la pata, calculando el incremento de volumen para cada rata y tiempo, datos sobre los que se aplica la *t* de Student con el fin de calcular su significación estadística

#### **C.5.4.2 Actividad Analgésica**

Por depresor del SNC o depresor central se entiende aquél fármaco que disminuye la actividad de diversos centros nerviosos (Litter, 1976). La depresión central puede manifestarse de distintas maneras:

- Anestesia general, pérdida de la sensibilidad, de la conciencia y de la motilidad de forma reversible.
- Hipnosis, estado de sueño.
- Sedación, atenuación de la hiperexcitabilidad nerviosa.
- Tranquilizantes, acción calmante de la hiperexcitabilidad psíquica con poca o ninguna tendencia al sueño
- Analgesia, alivio del dolor.
- Depresión de las funciones motoras centrales, supresión de las convulsiones.
- Depresión motora central, que puede traducirse en relajación muscular.

Debemos señalar que muchos de los fármacos utilizados poseen varias de las acciones indicadas y dependiendo de la dosis muestran unos efectos u otros.

### **Procedimiento**

El efecto analgésico de una sustancia puede ejercerse mediante un mecanismo central, periférico o ambos; para estudiar cada uno de estos mecanismos se pueden emplear distintos modelos experimentales. El método que seguimos para comprobar la

existencia de actividad analgésica de la especie en estudio fue el test de la placa caliente (Williamsom et al., 1996), debido a que éste permite estudiar tanto la analgesia de mecanismo central como la de mecanismo periférico.

En este caso, el estímulo doloroso aplicado es de tipo térmico. Se lleva a cabo colocando al animal sobre una placa de metal modelo Socrel DS 37, calentada a 53,5 °C mediante una resistencia eléctrica; sobre la placa existe un cilindro de plástico transparente que permite la observación del animal. Se recoge el tiempo transcurrido desde que el animal pone sus cuatro patas sobre la placa calorífica hasta que se lame las patas delanteras (considerado éste signo de dolor), se anota el tiempo antes y después del tratamiento (tiempo de reacción).

En primer lugar los ratones se distribuyen en 4 lotes de siete animales cada uno. Posteriormente se inyecta por vía intraperitoneal un volumen de 0,2 ml de disolución salina, conteniendo en este volumen la cantidad de extracto de *B. crassifolia* necesaria para que la dosis empleadas en cada lote sean las siguientes:

- 0,5 mg/kg de peso del extracto hidroalcohólico
- 1,2 mg/kg de peso del extracto diclorometánico
- 100 mg/kg de ácido acetil salicílico (patrón)

Una vez administrados los extractos en estudio y el patrón a los lotes correspondientes, se anota el tiempo de reacción de cada animal ( $t_{\text{después}}$ ), esto se realiza 30, 60, 120 y 180 min después de la administración, teniendo en cuenta que siempre se introduce cada ratón en el mismo orden con relación a los demás.

El análisis de los resultados se ha realizado mediante el método ANOVA por una vía incluido en el programa Statgraphic versión 4.1. La significación estadística se encuentra reflejada en las tablas correspondientes.

## C.6 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO

Para realizar el fraccionamiento del extracto, se llevo a cabo una cromatografía en columna flash. Previamente se ensayaron por cromatografía en capa fina distintas fases móviles con el fin de seleccionar aquella más adecuada para el fraccionamiento del extracto en las condiciones más idóneas.

### C.6.1 Estudio previo mediante Cromatografía en Capa Fina

El inicio de una columna cromatográfica debe ser respaldado por un estudio en cromatografía en capa fina (CCF) por ser esta técnica fácilmente reproducible en el desarrollo de la columna cromatográfica propiamente dicha al comportarse como una columna abierta.

En el estudio por CCF se empleó el material siguiente: Cámaras cromatográficas de vidrio, micropipetas, pulverizadores, lámpara de luz U.V de onda larga (365nm) y corta (254nm).

**Fase estacionaria:** Se utilizaron cromatofolios silicagel F 1500/LS Merck (254 nm de absorbancia).

**Fases móviles:** El desarrollo cromatográfico se llevó a cabo seleccionando aquellas fases móviles más convenientes para la separación de los principales componentes químicos presentes en el extracto: diclorometano, hexano, acetato de etilo, tolueno, acetona, diclorometano/acetato de etilo (8:2), metanol, tolueno/acetato de etilo (5:5)

**Reveladores:** Vainillina sulfúrica. Tras pulverizar las placas con el mismo, estas se introducen en la estufa a 100 °C durante 10 minutos.

### C.6.2 Cromatografía en columna

El extracto fue disuelto en diclorometano por ser totalmente soluble y se sometió como ya se ha indicado a cromatografía flash, al ser esta la modalidad de cromatografía en columna más adecuada para realizar separaciones en extracto brutos. Para ello se empleó Silicagel 60, 40-60  $\mu\text{m}$  (400-230 mesh).

Se realizó mediante la técnica de empaquetado en seco. Se eligió una columna con un diámetro apropiado. Siguiendo las recomendaciones expuestas por Still et al., 1978, la cantidad de silicagel no debe ser superior a cuatro veces el diámetro de la columna. Así distribuido se compacto dentro de la columna y se rellenó con la fase móvil elegida, haciéndola pasar a presión mediante una bomba situada en la cabeza de columna.

La muestra se disuelve en la fase móvil interponiendo esta disolución en la cantidad apropiada de silicagel 60 previamente desactivada con agua al 20 % p/v. Dicha disolución se deseca en rota-vapor a temperatura y presión controladas hasta que la fase estacionaria impregnada de muestra adquiere su estado inicial y se desprende fácilmente de las paredes del matraz. La muestra, perfectamente interpuesta en la fase estacionaria, es depositada posteriormente en la cabeza de columna.

La columna fue eluida con las fases móviles previamente seleccionadas, según los ensayos obtenidos por cromatografía en capa fina recogándose fracciones de 100 ml. La elución se inició con diclorometano, seguida de diclorometano/acetato de etilo y finalmente con metanol.

Posteriormente las fracciones fueron agrupadas según su comportamiento cromatográfico en capa fina en la misma fase móvil

### **C.6.3 Seguimiento de las fracciones mediante CCF**

Las fracciones procedentes del fraccionamiento fueron sometidas a un estudio por CCF como técnica previa para comprobar la presencia de los distintos componentes y según su comportamiento fueron agrupadas.

### **Procedimiento**

Fase Estacionaria: cromatofolios de gel de sílice 60 F254 (Merck)

Fase Móvil: diclorometano/agua



Las fracciones se depositan, apropiadamente disueltas, en forma puntual a 1,5 cm del borde de la placa con ayuda de un capilar de vidrio.

El desarrollo se realiza en cámaras de vidrio previamente saturadas con los vapores procedentes de las fases móviles. Una vez extraídas las placas de las cámaras, se dejan secar y se observan al visible; posteriormente se visualizan a 254 nm y 354 nm y por último, se continúa con su revelado. Se anotan los  $R_f$  de los compuestos en estudio.

El revelador empleado para poner de manifiesto los compuestos presentes fue la vainillina sulfúrica. Tras la pulverización de las placas con el mismo, estas se introducen en estufa a 100 °C durante 10 minutos. Este reactivo revela entre otras cosas la presencia de compuestos de estructura triterpénica.

#### **C.6.4 Identificación de compuestos**

Se llevó a cabo mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN Y  $^{13}\text{C}$ -RMN Para la realización de los espectros de resonancia, se dispuso de dos espectroscopios: Bruker AC-250 (250 MHz) y Varian XL-300.

Se empleó una columna Varian 5 de 30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  (5% de difenilsiloxano y 95% de dimetilsiloxano) con presión en cabeza de columna de -10 pSi y empleando helio como gas portador. La interfase de haz de partículas y la ionización se llevó a cabo por impacto electrónico (modo de ionización positivo).

Para la elucidación estructural de los compuestos aislados se realizaron los espectros de resonancia de  $^1\text{H}$  en el espectroscopio Varian XL-300 (300 MHz) utilizando como disolvente de los productos problema dimetilsulfóxido y agua deuterada. Para realizar los espectros de resonancia de  $^{13}\text{C}$  se empleó el espectrómetro Varian XL-300 (75 MHz) utilizando como disolvente también dimetilsulfóxido.

## **C.7 AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO**

### **C.7.1 Restitución**

Partiendo del extracto inicial. Se llevan a cabo dos tipos de restitución:

Una parte del extracto se concentra a residuo seco y posteriormente se realiza una primera disolución con Et OH/ H<sub>2</sub>O (80:20).

Para llevar a cabo la disolución se parte de 10 gramos del extracto inicial (extracto EI) y se disuelven en Et OH /H<sub>2</sub>O (80 :20), una vez disuelto se concentra en rotavapor y posteriormente se añaden 30 ml de H<sub>2</sub>O. Estos 30 ml se mantienen en frío durante 3 días consecutivos, en los cuales se produce una precipitación espontánea que es eliminada por decantación.

El sobrenadante se centrifuga a 12000 r.p.m durante 15 minutos, al cabo de este tiempo se obtiene un pellet y un sobrenadante (extracto EA). El pellet se lava 3 veces a con 10 ml de H<sub>2</sub>O y se centrifuga a 20000 r.p.m durante 30 minutos. Este pellet una vez lavado se liofiliza y se conserva para su estudio posterior.

Las pruebas se realizan por duplicado

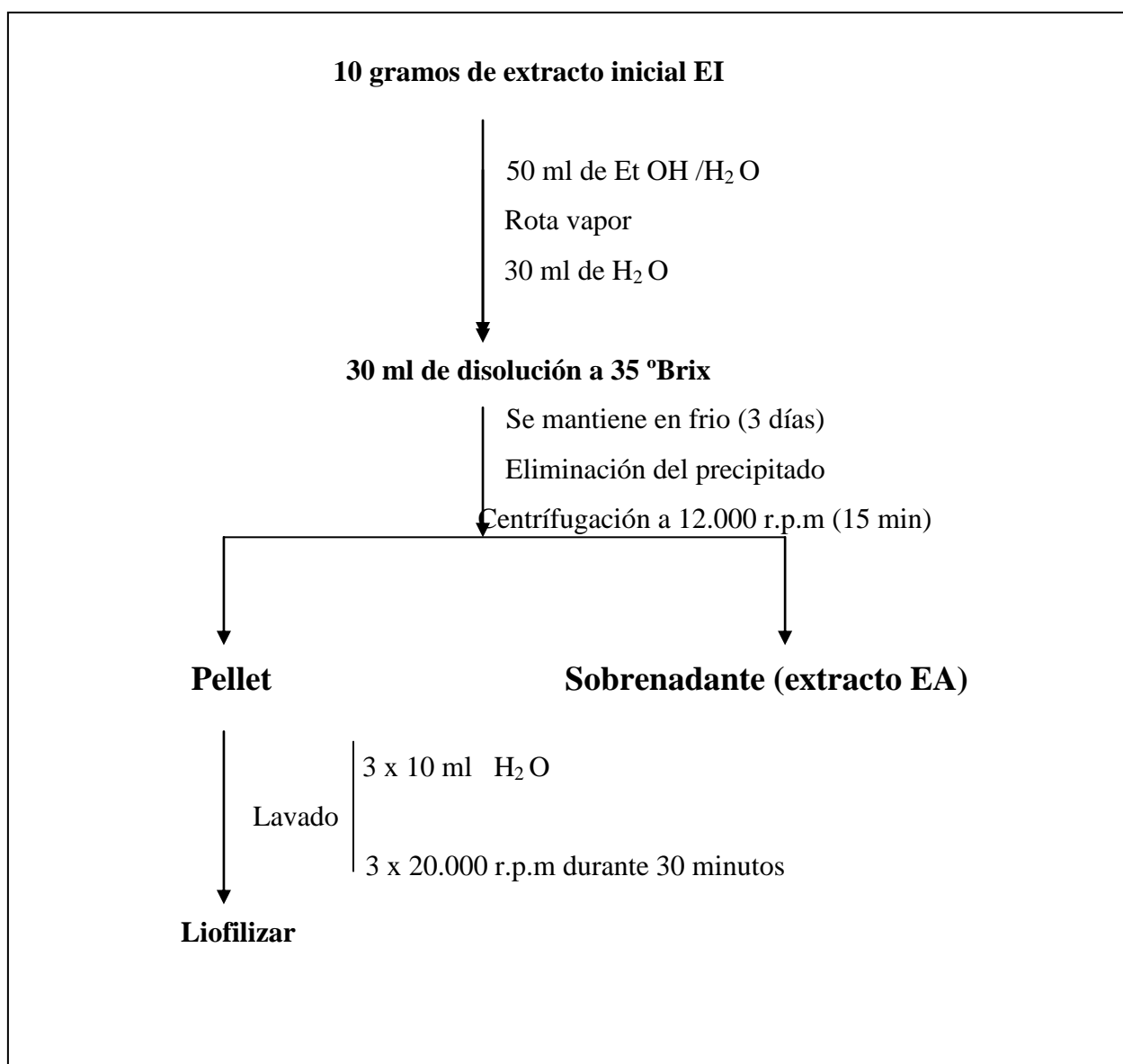
Tras la obtención de los dos extractos (extracto EA y EH), se determinan en los mismos una serie de parámetros: grados Brix, % humedad, pH, acidez total, se estudia el contenido de polifenoles y taninos condensados presentes en los extractos.

El grado Brix es el porcentaje de sólidos solubles presentes en una muestra. Con el fin de determinar la concentración en la que se trabaja después de las diferentes diluciones se realiza una recta de calibrado relacionando los ° Brix con la concentración expresada en g/ml, para ello se determina 35 °Brix. La determinación se realiza mediante un refractómetro modelo Handheld 701/711.

## Procedimiento

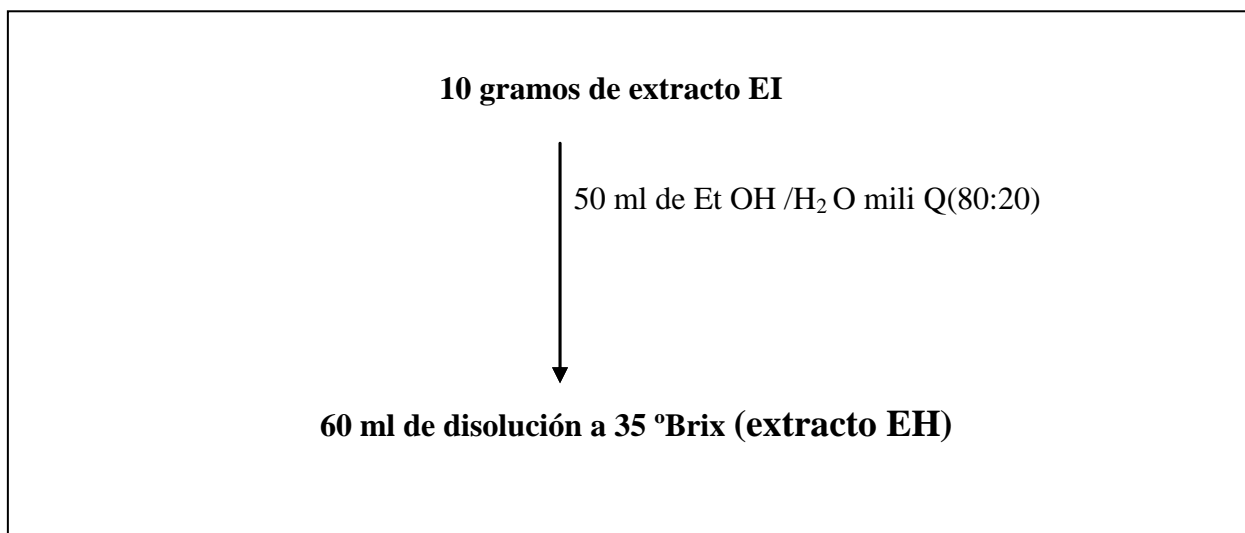
Se toman en un matraz 1 ml de EA y EH, respectivamente se colocan en un matraz la gota se descuenta del volumen total tarado previamente y se añade 500  $\mu$ l de extractante se coge una gota y se mide la densidad por refractometría.

Se evapora a sequedad y se calcula el extracto seco sobre el volumen de la muestra.



**Tabla 6:** Preparación de las muestras del extracto acuoso(extracto EA)

Otros 10 gramos del extracto hidroalcohólico inicial se disuelven con 50 ml de EtOH/ H<sub>2</sub> O (80:20) para realizar las pruebas necesarias para su estudio y análisis.



**Tabla 7:** Preparación de las muestras del extracto hidroalcohólico (extracto EH)

Se lleva a cabo un barrido espectrofotométrico (780-190  $\lambda$ ) para conocer a que longitud de onda absorbe la muestra. Se utilizan cubetas de 1 mm. Todas las medidas de las muestras se realizan por duplicado

#### C.7.1.1 Humedad, pH y acidez total

La humedad de una muestra representa el porcentaje en masa de agua asociada a ella de forma no estequiométrica. Existen muchos métodos para la determinación de la humedad, aunque el más utilizado es pérdida de peso por desecación en estufa. Se calienta una alícuota del extracto a temperatura superior a 100°C. Se mide la pérdida de peso.

Para que la pérdida de humedad sea rápida y uniforme la muestra debe extenderse por toda la base del recipiente. La estufa de desecación debe funcionar a 105° ya que esta temperatura es la más indicada en la determinación.

## Procedimiento

Se realizó el estudio de humedad por gravimetría. Se tomó 1 ml de cada extracto EA y EH a 35 °Brix (por duplicado) que se dispuso en una Placa Petri pequeña para proceder a su calentamiento en estufa a 50-60 °C hasta evaporación por completa del disolvente. A partir de ese momento la temperatura se eleva a 105°C. Las placas Petri se mantuvieron a dicha temperatura hasta peso constante.

Se anotó el peso de la placa Petri (vacía), con el extracto antes de la desecación secar y con el residuo sólido después del secado. Las pruebas se realizaron por triplicado.

La acidez de los extractos se expresa normalmente como el contenido total de todos los ácidos y referido al más importante que es el tartárico. La determinación de la acidez total se realiza en la práctica en base a una valoración ácido-base, utilizando como reactivo de valoración una base fuerte, hidróxido de sodio.

Se usa comúnmente como indicador fenolftaleína, virando el color de la muestra a un tono verde pardo. En este momento se anota el volumen gastado de la disolución de NaOH.

La medición de pH y de la acidez total se realiza en un Electrodo Crison Compact Titrator Azúcar/ SO2 SN:34702.

Para realizar la medida de la acidez se disuelven 5 ml de EA y EH en 50 ml de H<sub>2</sub>O y Et OH /H<sub>2</sub>O (80:20) respectivamente para ser medidos por el electrodo

Para llevar a cabo la estabilización del electrodo se utilizaron dos soluciones de pH 4 y pH 7,5 indistintamente. La medida del pH se realizó sobre una muestra de 2 ml.

### **C.7.1.2 Compuestos polifenólicos**

La valoración de los polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Folin Ciocalteau (FC) (Georgé et al., 2005). Los reactivos utilizados fueron la solución acetona/agua (7/3 v/v), solución de carbonato de sodio ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ), solución de Folin (diluida en 10 partes de agua), ácido gálico ( $5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ).

## **Procedimiento**

**Preparación de una disolución de 500 ml de carbonato sódico anhidro de concentración 75 g/l.** Se pesan en una balanza analítica 37,5 gramos de  $\text{Na}_2 \text{CO}_3$  anhidro en un vaso de precipitado previamente tarado. Se disuelve con una alícuota de agua destilada y se trasvasa a un matraz de 500 ml.

- 0,1 ml de extracto EA se diluyen en 10 ml de  $\text{H}_2 \text{O}$
- 0,1 ml de extracto EH se diluyen en 10 ml de Et OH/ $\text{H}_2 \text{O}$  (80:20)

En un matraz aforado de 25 ml se añaden 0,5 ml de muestra, 0,5 ml de reactivo de Folin, 10 ml de la disolución de carbonato sódico anhidro; enrasar con agua destilada hasta 25 ml.

Dejar reaccionar durante una hora y medir la absorbancia a 750 nm. La concentración de polifenoles se determina por extrapolación en la recta de calibrado expresado en g/l ácido gálico.

### **Recta de calibrado**

- **Preparación de la disolución madre**

Se prepara una disolución de 100 ml de ácido gálico de concentración 4 g/l que servirá como disolución madre, a partir de la cual se obtendrán las diferentes disoluciones, según se indica en la tabla 8 , con las que se elaborará la recta de calibrado

Para ello se pesan en una balanza analítica 0,402 g de ácido gálico del 99,5 % de pureza y se lleva a un matraz aforado de 100 ml, enrasando con agua destilada.

Se toma el volumen indicado en la tabla 8 anexa de la disolución madre y se lleva a un matraz de 25 ml, enrasando con agua destilada.

disolución madre (4 g/l)	Concentración patron (mg/l)
0,125	20
0,625	100
1000	160
2000	320
2500	400
3000	480

**Tabla 8:** Preparación de concentración de patrones a partir de la disolución madre de ácido gálico para realizar una recta de calibrado.

Tomar 0,1 ml de cada una de las disoluciones patrón, añadir 0,5 ml de reactivo de Folin, junto con 10 ml de la disolución de ácido gálico.

### C.7.1.3 Taninos condensados totales

El estudio para la determinación de los taninos condesados totales se realiza sobre los extractos acuoso e hidroalcohólico (EA y EH), según el procedimiento que se recoge a continuación:

#### Procedimiento

- 0,1 ml de extracto EA se diluyen en 25 ml de H<sub>2</sub> O
- 0,1 ml de extracto EH se diluyen en 25 ml de Et OH/H<sub>2</sub>O (80:20)

**Reactivo clorhídrico:** 0,15 g de sulfato ferroso (con 7 moléculas de cristalización), en la mezcla 500 ml n-Butanol y 500 ml de Ácido clorhídrico concentrado.

En un matraz de fondo redondo de 500ml se disponen 0,2 ml de las disoluciones, añadiendo 20 ml de reactivo clorhídrico, Se colocan en un refrigerante de aire y se calientan al baño maría durante una hora. Al cabo de ese tiempo se deja enfriar, y se enrasa en un matraz de 25 ml con el reactivo clorhídrico.

Se precede a la medición de la absorbancia a 550 nm frente a un testigo preparado de igual manera y al mismo tiempo que el problema pero sin ser sometido a calentamiento.

#### **C.7.1.4 Identificación de fenoles mediante HPLC**

Se toman 50 ml de los extractos EA y EH en una ampolla de decantación. A continuación se añaden 25 ml de eter dietílico y se agita, tomando la precaución de eliminar los gases formados en la mezcla, se deja reposar y se separan dos fases.

La fase inferior (acuosa) se recoge en un erlenmeyer de 100 ml. La fase superior (orgánica) se lleva a un erlenmeyer de 250 ml.

Se repite la extracción de la fase acuosa con una nueva porción de 25 ml de eter dietílico. Se agita nuevamente y se deja reposar hasta la separación de las dos fases. Se repite la experiencia con una nueva porción de 25 ml de eter dietílico. En total se extrae por tres veces.

Este procedimiento de repite, utilizando como disolvente acetato de etilo en lugar de eter dietílico.

Una vez recogidas todas las fracciones de fase orgánica (3x25 ml de eter dietílico y 3x25 ml de acetato de etilo) se añade sulfato sódico anhidro y se deja reposar durante 20 minutos. Se decanta la disolución pasándola a través de un papel de filtro.



Se evapora en rotavapor la fase orgánica hasta sequedad, recogiendo el residuo sólido en un matraz de fondo redondo de 25 ml. Se redisuelve con 2 ml de una disolución de metanol/agua 50:50 y se lleva a un matraz de 4 ml.

Preparación del blanco. Se procede de igual forma sustituyendo la muestra con agua destilada.

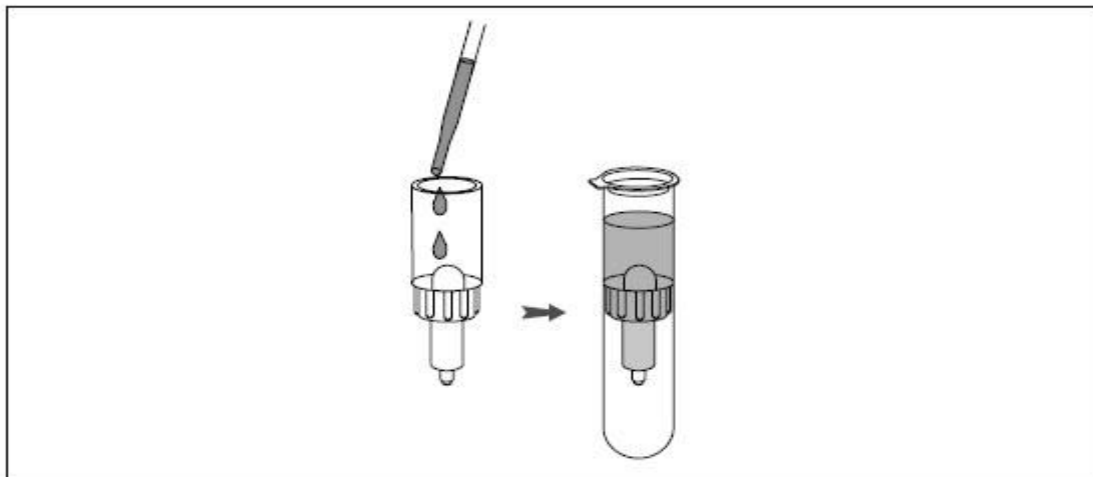
### **C.7.2 Eliminación de Complejos Macromoleculares**

Con el fin de realizar una purificación del extracto se procedió a la eliminación de los complejos moleculares llevándose a cabo sobre las muestras acuosas (EA). Esta técnica se desarrolló para eliminar dichos complejos macromoleculares presentes en las muestras en estudio, con el fin de mejorar la resolución al identificar las muestras por HPLC

### **Procedimiento**

Para la purificación y eliminación de complejos macromoleculares se utilizaron cartuchos Millipore Citri-Plus 20 y Millipore Citri-Plus 10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Estos cartuchos constan de una membrana interna con un diámetro de poro 0,3 y 0,1  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La membrana interior está inclinada para aumentar la superficie de contacto con la muestra y ayuda a una mejor separación. Se empleó una membrana de celulosa regenerada (CR) de tamaño de corte de 30 kDa y otra membrana de celulosa regenerada (CR) de tamaño de corte 10 kDa.

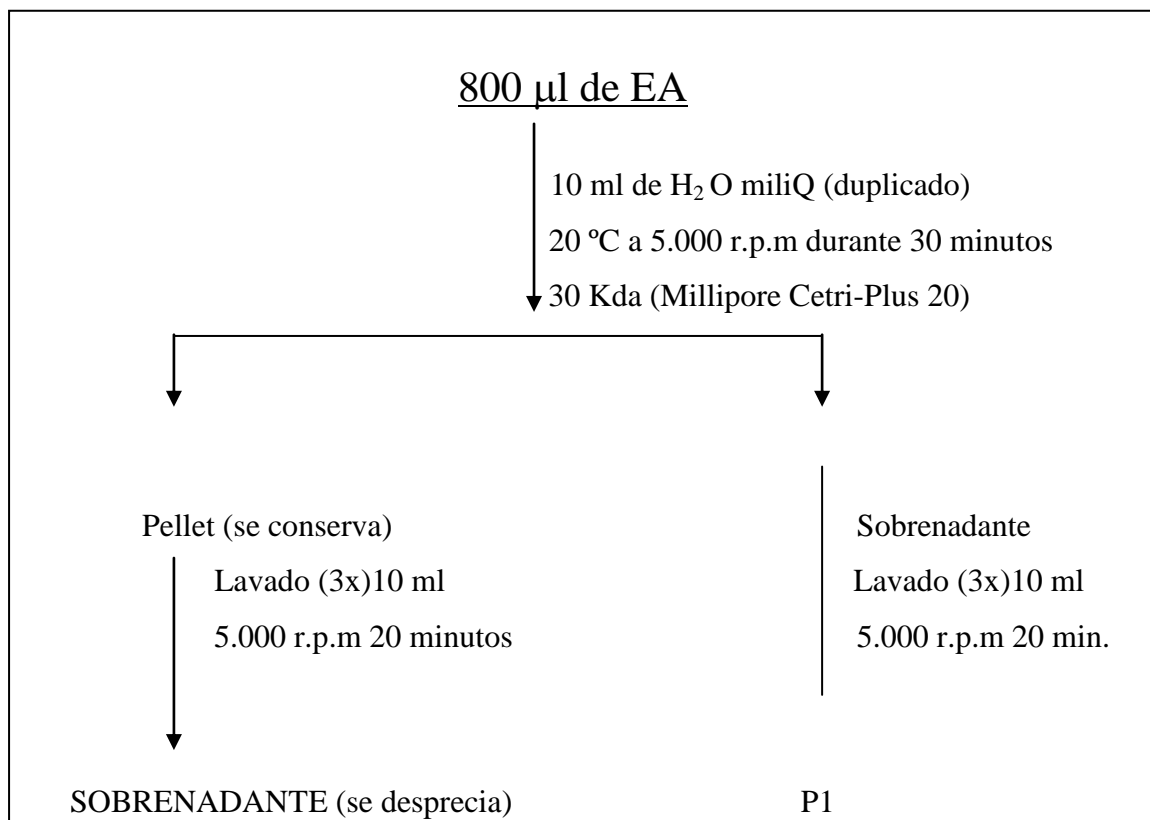
Se prepararon 10 ml de muestra para una mejor separación y purificación



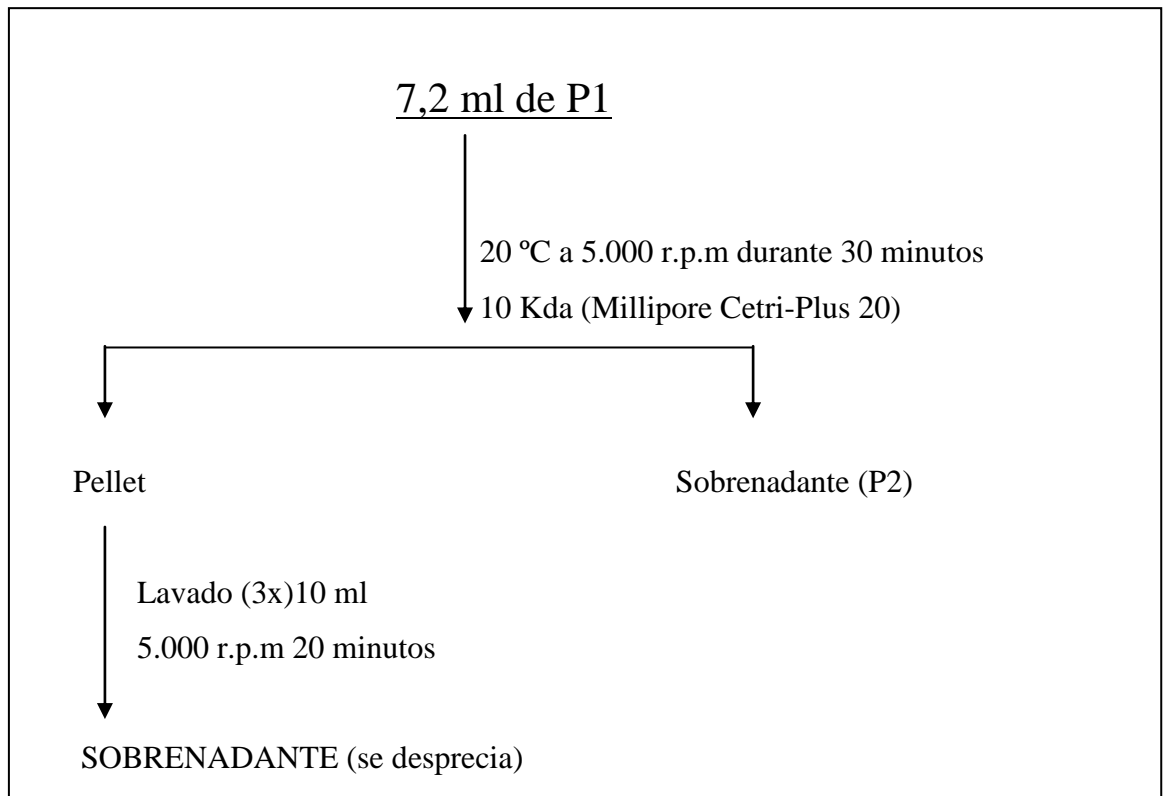
**Figura 3:** Eliminación de los complejos macromoleculares con membranas internas con un diámetro de poro de 0,3 y 0,1  $\mu\text{m}$

Se coge una alícuota de 800  $\mu\text{l}$  del extracto acuoso (EA) en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente se sitúan 8 ml en un cartucho de membrana de tamaño de corte de 30 Kda (Millipore Cetri-Plus 20), para ser centrifugados a 20  $^{\circ}\text{C}$  a 5.000 r.p.m durante 30 minutos.

Las pruebas se realizan por duplicado



**Tabla 9:** Preparación de muestras a partir del extracto acuoso en la primera filtración a través de una membrana de celulosa regenerada de tamaño de corte de 30 Kda



**Tabla 10:** Preparación de muestras a partir del extracto acuoso en la primera filtración a través de una membrana de celulosa regenerada de tamaño de corte de 10 Kda

### C.7.3 Separación de los componentes por HPLC

Para ello se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficacia Waters bomba Waters 600 equipado con un horno modelo Waters TCM 060 M, un procesador de datos Waters 717 plus y detector Photodiode Array Waters 2996 operando a 220-360 nm.

Las condiciones se establecieron en fase reversa, empleandose una columna Nova-Pak C<sub>18</sub> 60 A, con una tamaño de partícula de 4µm y 3,9 diametro interno y 300 mm de longitud, Ref. WAT 011695; Waters, Cromatografía, S.A Barcelona, España.

#### Procedimiento

Fase Móvil

Fase móvil A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (98:2)

Fase móvil B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>CN (78:2:20)

Fase móvil C: CH<sub>3</sub>CN

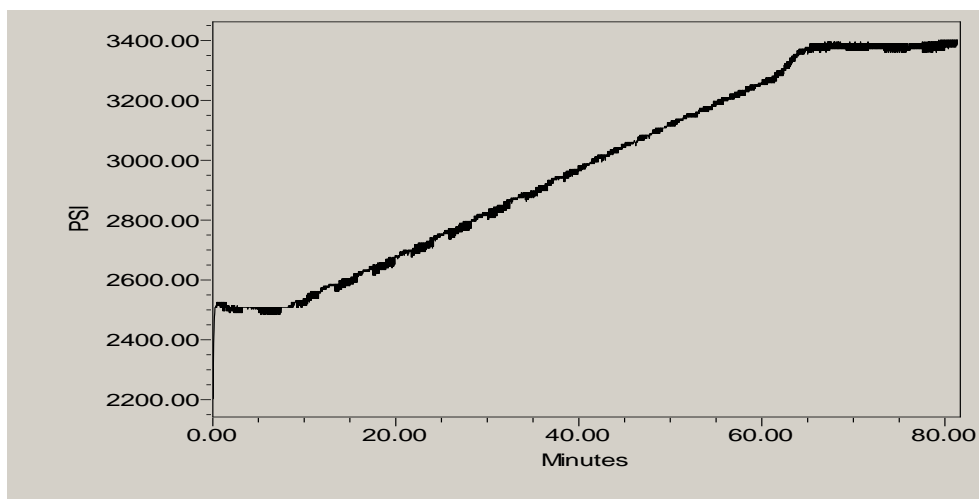
El tiempo de análisis fue de 90 minutos. El flujo se mantuvo constante a 1-1,2 ml/min. La temperatura del horno para la columna se fijó a 30 °C.

En la tabla 11 se recoge el gradiente utilizado para el análisis.

Gradiente:

	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0.00	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0	6
2	55.00	1.00	20.0	80.0	0.0	0.0	6
3	57.00	1.20	10.0	90.0	0.0	0.0	6
4	70.00	1.20	10.0	90.0	0.0	0.0	6
5	80.00	1.20	5.0	95.0	0.0	0.0	6
6	90.00	1.20	0.0	100.0	0.0	0.0	6
7	100.00	1.00	0.0	20.0	80.0	0.0	6
8	105.00	1.00	0.0	0.0	100.0	0.0	6
9	110.00	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0	6
10	120.00	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0	6

*Tabla 11: variación gradual de la composición de la fase móvil durante la elución*



**Figura 4:** Representación de la variación de la presión (PSI) durante la elución

### C.7.4 Estudio farmacológico

Los barbitúricos son un grupo de fármacos con propiedades sedantes e hipnóticas. Todos ellos derivan del ácido barbitúrico, y deben su actividad a la presencia de grupos alquilo o arilo en la posición 5.

La acción de los barbitúricos puede ser reforzada por la de otros fármacos, dando lugar a un sinergismo de acción. Estas sustancias potenciadoras del sueño inducido por barbitúricos son depresoras del SNC

En la realización del Test de Irwin se observó una actividad depresora del SNC de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, por lo que se ha considerado interesante comprobar si producen dicha potenciación del sueño. Por ello, se seleccionó el test del Sueño inducido por pentobarbital sódico, ensayándose en las fracciones P1 y P2

## Procedimiento

Transcurridos 30 minutos de la administración por vía intraperitoneal de los productos en estudio, se administra por la misma vía, 60 mg de pentobarbital sódico, anotándose a continuación para cada animal el tiempo de inducción al sueño ( $t_1$ ) y el tiempo de duración del mismo ( $t_0$ ).

Como norma general, los animales se tambalean inmediatamente; si se les administra una dosis determinada de un fármaco, el tiempo que tardan en dormir por sí mismos es el tiempo de sueño, e indica la duración de la acción de una dosis del fármaco.

## **D. RESULTADOS**



## D.1 RENDIMIENTO DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN

El rendimiento de los extractos se calculó en relación con planta seca. En la tabla 12 se recogen los rendimientos obtenidos para los dos extractos,

EXTRACTOS	RENDIMIENTO (%)
<i>Diclorometánico</i>	2,48
<i>Hidroalcohólico (etanol/agua) (8:2)</i>	30,5

**Tabla 12:** Rendimientos obtenidos en la extracción con diclorometano y etanol/agua (8:2).

## D.2 Estudio Micrográfico

Se realizó la observación con ayuda de un microscopio para poder determinar las características que permitan identificar la corteza de *B. crassifolia*

Se puso de manifiesto la existencia de almidón como contenido celular mediante una tinción con agua de yodo.

Se realizaron otras tinciones tal y como se recoge en material y métodos y se comprobó la existencia de una gran número de fibras sencillas, restos de súber y escleridas. Igualmente se comprobó la ausencia de vasos, tal como cabría esperar al tratarse de una corteza.

### D.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

#### D.3.1 Screening fitoquímico

Se preparó una infusión de *B. crassifolia*. Tras realizar ensayos sencillos de coloración y precipitación en tubo de ensayo se obtienen los resultados que se presentan en la tabla 13.

COMPONENTES	RESULTADOS
Taninos	++++
Flavonoides	-
Antraquinonas	-
Saponinas	++
Alcaloides	-

**Tabla 13:** Resultados del estudio fitoquímico (++++alto contenido, +++medio contenido, ++bajo contenido, +muy bajo,-no detectado).

### D.3.2 Cromatografía en capa fina

Los extractos preparados a partir de la corteza (extracto diclorometánico e hidroalcohólico), se estudiaron mediante CCF, con ello se intentó poner de manifiesto los diferentes grupos químicos así como los compuestos que pudieran ser interesantes en relación con su actividad farmacológica.

Se inició este estudio con una selección de diferentes fases móviles tal como se recoge en material y métodos, para seleccionar aquellas más adecuadas que permitieran obtener una buena separación de los diferentes constituyentes de los extractos.

La fase móvil seleccionada fue n-butanol/ácido acético glacial /agua (5:1:4 fase superior). Los cromatofolios, una vez desarrollados se revelaron con diferentes reactivos a fin de poner de manifiesto los diferentes grupos químicos presentes en los extractos.

En la tabla 14 se recogen los resultados obtenidos para los extractos diclorometánico e hidroalcohólico tras su estudio cromatográfico.

Principios activos	Extracto diclorometánico	Extracto hidroalcohólico
TANINOS	-	++++
FLAVONOIDES	-	-
ANTRAQUINONA	-	-
CUMARINAS	-	-
ACEITE ESENCIAL	+++	-
TRITERPENOS	++++	++
ALCALOIDES	-	-
SAPONINAS	+++	-

**Tabla 14:** resultados obtenidos en el estudio cromatográfico (++++alto contenido, +++medio contenido, ++ bajo contenido, +muy bajo, -no detectado).

## D.4 ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS

### D.4.1 Toxicidad

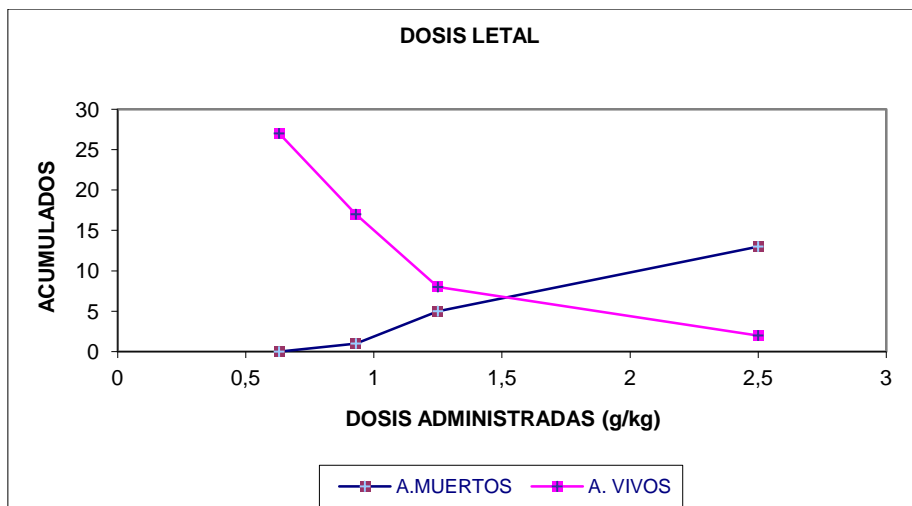
#### D.4.1.1 *In vivo*. Cálculo de la Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

##### Extracto Hidroalcohólico

La tabla 15 recoge los resultados obtenidos en el cálculo de la Dosis Letal 50 (L<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico y la gráfica 1 la representación gráfica de los valores obtenidos

Concentracion (g planta seca/kg peso del animal)	Total de animales	Nº de animales muertos	Nº de animales vivos	Nº acumulado de animales muertos	Nº acumulado de animales vivos	Total	Proporción de letalidad	Proporción de supervivencia
0,62	10	0	10	0	27	27	0	1
0,93	10	1	9	1	17	17	0,05	0,94
1,25	10	4	6	5	8	8	0,38	0,61
2,50	10	8	2	13	2	2	0,86	0,13

**Tabla 15:** Resultados obtenidos en el cálculo de DL<sub>50</sub> (extracto hidroalcohólico).



**Gráfica 1:** Representación gráfica del cálculo de la dosis letal 50 para el E. Hidroalcohólico

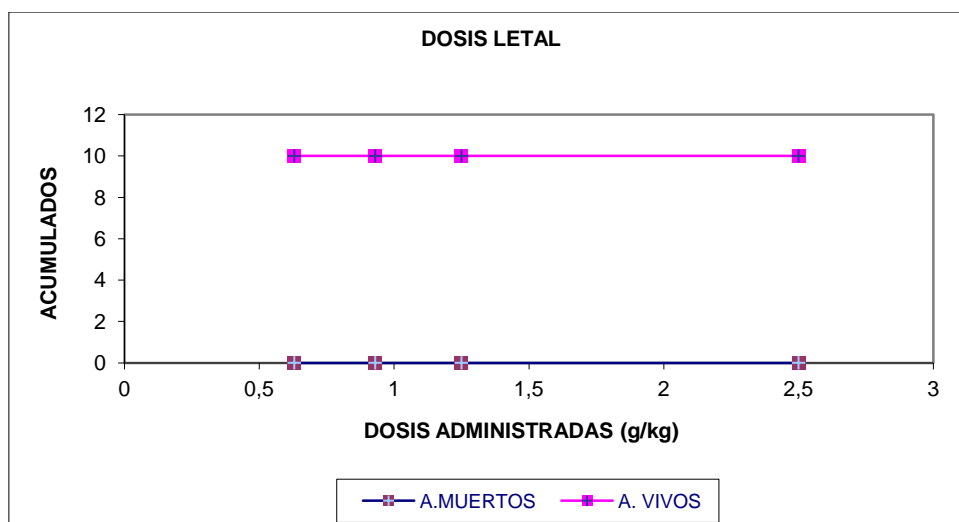
**La Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) quedó establecida en 1,5 g de planta seca/Kg de animal**

**Extracto Diclorometánico**

La tabla 16 recoge los resultados obtenidos de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para el extracto diclorometánico y la grafica 2 la representación gráfica de los valores obtenidos

Concentracion (g planta seca/kg peso del animal)	Nº de animales	Nº de animales muertos	Nº de animales vivos	Nº acumulado de animales muertos	Nº acumulado de animales vivos	Total	Proporción de letalidad	Proporción de supervivencia
0,62	10	0	10	0	10	10	0	1
0,93	10	0	10	0	10	10	0	1
1,25	10	0	10	0	10	10	0	1
2,50	10	0	10	0	10	10	0	1

**Tabla 16:** Resultados obtenidos en el cálculo de DL<sub>50</sub> (extracto diclorometánico).



Gráfica 2: Representación gráfica del cálculo de la  $DL_{50}$  para el E. Hidroalcohólico

**El extracto diclorometánico no presentó toxicidad a las dosis ensayadas**

### D.4.2 Test de Irwin

A continuación se presentan los resultados obtenidos tras la realización del Test de Irwin con los dos extractos de la especie vegetal objeto de este estudio.

Se seleccionó la dosis correspondiente a 1/3 de la  $DL_{50}$  (0,5 g/kg) para el extracto hidroalcohólico y 1,25 g/kg para el extracto diclorometánico. Para una mejor comprensión de los datos obtenidos y una simplificación de los mismos, los resultados se recogen en las tablas 17 y 18. Las puntuaciones numéricas han sido sustituidas por flechas, tal como se resume a continuación a fin de poder visualizar con más claridad los resultados.

Para respuestas cuyo valor numérico en condiciones normales es 4:

- Puntuación 0: ↓↓↓↓
- Puntuación 1: ↓↓↓
- Puntuación 2: ↓↓
- Puntuación 3: ↓
  
- Puntuación 5: ↑
- Puntuación 6: ↑↑
- Puntuación 7: ↑↑↑
- Puntuación 8: ↑↑↑↑

Para respuestas cuyo valor numérico en condiciones normales es 0:

- Puntuación 1: ↑
- Puntuación 2: ↑↑
- Puntuación 3: ↑↑↑
- Puntuación 4: ↑↑↑↑



## **EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO**

A la dosis ensayada (0,5 g de planta/kg) el extracto hidroalcohólico produce sobre el SNC, que aparece transcurridos pocos minutos tras su administración y persiste en el tiempo. Concretamente se comprobó una disminución en algunos de los parámetros, como actividad motora espontánea, tono muscular y ritmo respiratorio.

El resultado obtenido se encuentra reflejado en la Tabla 17.

## **ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO**

Dentro de los apartados de percepción-conciencia y disposición de ánimo se han observado cambios en el grupo tratado respecto al grupo control.

En lo referente a la actividad motora, se ha observado una disminución en la actividad espontánea.

La reactividad y la respuesta al tacto no se encuentran disminuidas.

## **ESTUDIO NEUROLÓGICO**

El extracto estudiado no produce, a la dosis ensayada, excitación del SNC ni incoordinación motora. El tono muscular disminuye prolongándose esta situación a lo largo de la prueba.

## **ESQUEMA AUTÓNOMO**

A lo largo de todo el tiempo que dura el experimento tan solo se puso de manifiesto una disminución del ritmo respiratorio, no observándose alteraciones en ningún otro parámetro.

## **EXTRACTO DICLOROMETÁNICO**

A la dosis ensayada (1,25 g de planta/kg) se pudo comprobar un escaso efecto sobre el SNC. era muy escaso. El resultado obtenido se encuentra reflejado en la Tabla 18.

## **ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO**

No se han observado cambios referentes a la percepción-conciencia, ni en la disposición de ánimo.

En cuanto a la actividad motora, se observa una ligera disminución de la actividad espontánea, y en menor medida de la reactividad, en relación con el grupo control.

Tiempo (h)							
24h	6h	3h	1½	½h			
					ALERTA	Percepción Conciencia	COMPORTAMIENTO
					ESTEREOTIPIA		
					PASIVIDAD		
					ASEO	Disposición de ánimo	
					INTRANQUILIDAD		
					IRRITABILIDAD, AGRESIÓN		
↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	ACTIVIDAD ESPONTÁNEA	Actividad motora	
		↓↓	↓↓	↓↓	REACTIVIDAD		
					RESPUESTA AL TACTO		
					COLA DE STRAUB	Excitación del S.N.C	ESTUDIO NEUROLOGICO
					TEMBLORES		
					CONVULSIONES		
					VOLTERETA ENDEREZAMIENTO	Incoord. Motora	
↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	TONO DE EXTREMIDADES	Tono Muscular	
					APREHENSIÓN		
↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓	TONO DEL CUERPO		
↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	TONO ABDOMINAL		
					REFLEJO PINEAL	Reflejos	
					REFLEJO CORNEAL		
					RIF(Reflejo ipsilateral flexor)		
					APERTURA PALPEBRAL		ESQUEMA AUTONOMO
					EXOFTALMOS		
					SALIVACIÓN		
					SIGNO DE RETROCESO		
					PILOERECCIÓN		
					HIPOTERMIA		
	↓	↓	↓	↓	RITMO RESPIRATORIO		

**Tabla 17:** Resultados del Test de Irwin para el extracto hidroalcohólico

Tiempo (h)							
24h	6h	3h	1½	½h			
					ALERTA	Percepción Conciencia	COMPORTAMIENTO
					ESTEREOTIPIA		
					PASIVIDAD		
					ASEO	Disposición de ánimo	
					INTRANQUILIDAD		
					IRRITABILIDAD, AGRESIÓN		
		↓↓	↓↓	↓↓	ACTIVIDAD ESPONTÁNEA	Actividad motora	
		↓	↓	↓	REACTIVIDAD		
					RESPUESTA AL TACTO		
					COLA DE STRAUB	Excitación del S.N.C	ESTUDIO NEUROLOGICO
					TEMBLORES		
					CONVULSIONES		
					VOLTERETA ENDEREZAMIENTO	Incoord. Motora	
					TONO DE EXTREMIDADES	Tono Muscular	
					APREHENSIÓN		
					TONO DEL CUERPO		
					TONO ABDOMINAL	Reflejos	
					REFLEJO PINEAL		
					REFLEJO CORNEAL		
					RIF(Reflejo ipsilateral flexor)		ESQUEMA AUTONOMO
					APERTURA PALPEBRAL		
					EXOFTALMOS		
					SALIVACIÓN		
					SIGNO DE RETROCESO		
					PILOERECCIÓN		
					HIPOTERMIA		
					RITMO RESPIRATORIO		

**Tabla 18:** Resultados del Test de Irwin para el extracto diclorometánico

### D.4.3 Estudios Neurofarmacológicos

#### D.4.3.1 Test de la actividad motora espontánea

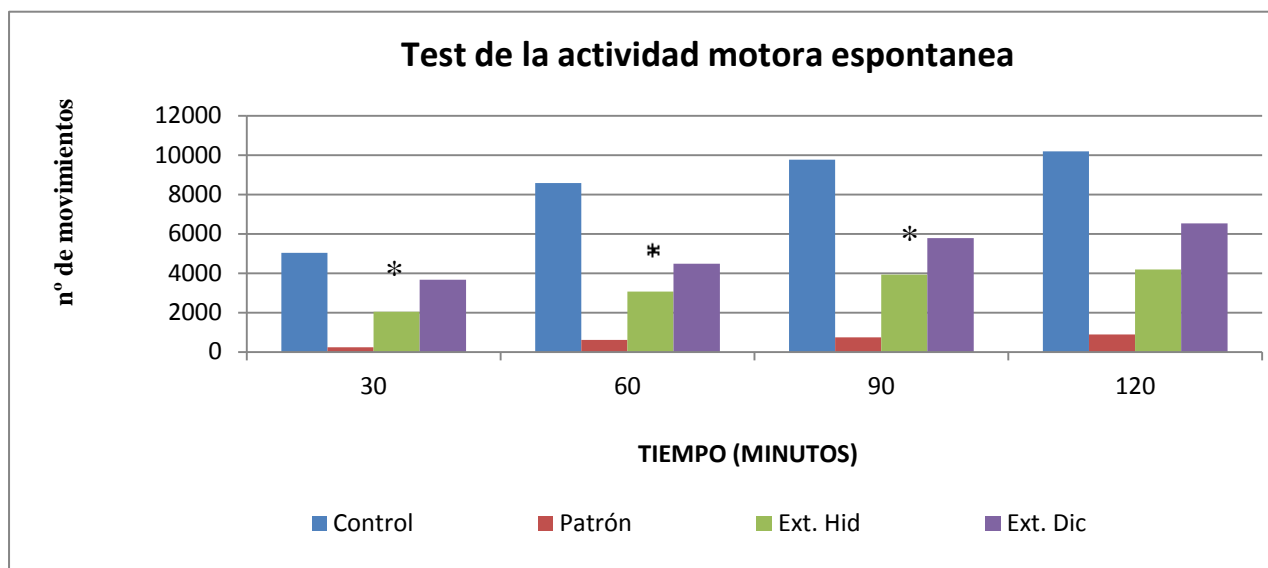
Los extractos diclorometánico (1,25 g de planta seca/kg de peso) e hidroalcohólico (0,5 g de planta seca/ kg de peso) administrados por vía intraperitoneal, provocan una disminución de la actividad motora espontánea del animal. Se utiliza como sustancia de referencia o patrón haloperidol 6 mg/kg.

El porcentaje de disminución de la actividad motora espontánea a las dosis estudiadas, en referencia al grupo control, fue significativo para el extracto hidroalcohólico, llegando hasta un 60,9%.

En la tabla nº 19, se reflejan los valores medios reales de disminución de la actividad motora espontánea con respecto al grupo control, a los distintos tiempos registrados. Igualmente en la grafica 5, se representan los valores recogidos en la tabla 19.

Tiempo (minutos)	Nº de movimientos			
	Control	Patrón	Ext. Hid	Ext. Dic
<b>30</b>	5030	240	3675(*)	2039
<b>60</b>	8577	610	4489(*)	3059
<b>90</b>	9768	740	5790(*)	3925
<b>120</b>	10184	840	6532	4191

**Tabla 19:** Resultados obtenidos en el estudio de la actividad motora espontánea reflejándose los valores medios reales obtenidos (\*  $p < 0,05$ )



**Gráfica 5:** Representación gráfica de la disminución de la actividad motora espontánea. Representándose los valores medios reales de los movimientos efectuados por los animales de experimentación tratados frente al grupo control y patrón.. \*  $p < 0,05$

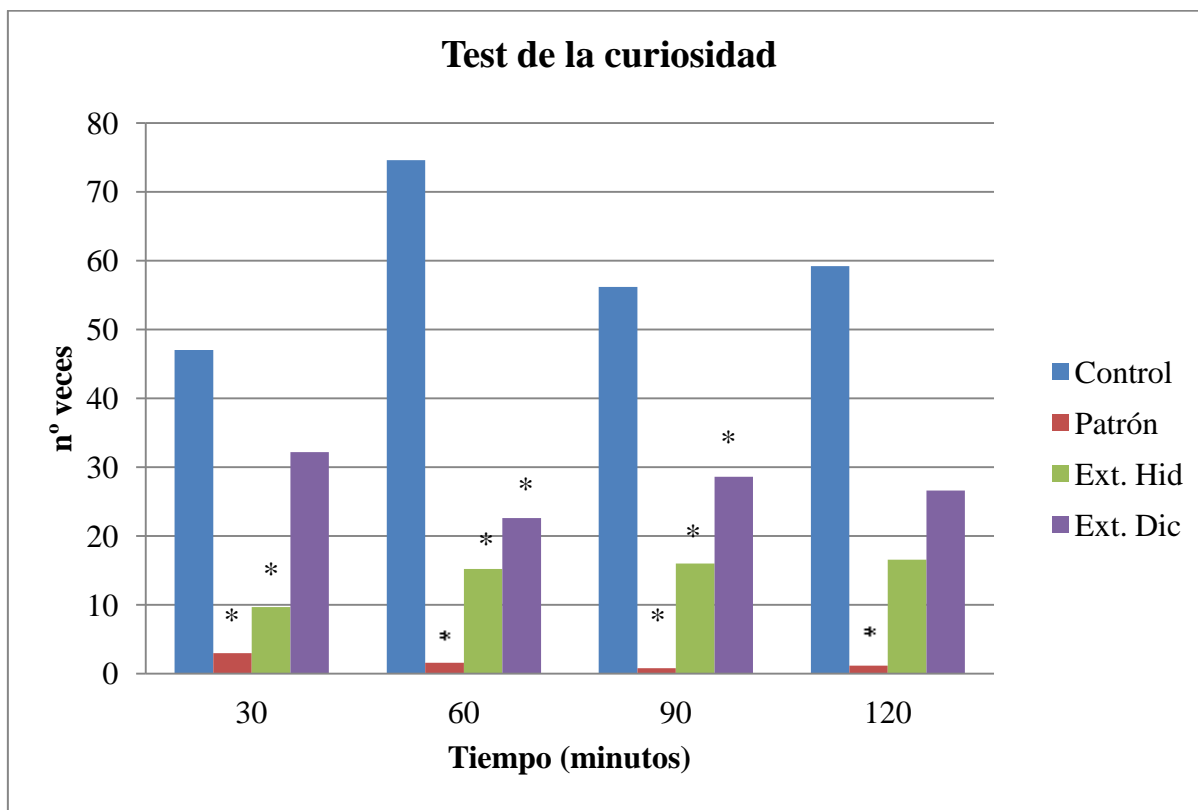
#### D.4.3.2 Test de la curiosidad

El extracto hidroalcohólico de la corteza administrado vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 g de planta seca/kg de peso ocasiona una disminución de la actividad exploratoria en los animales de experimentación frente al grupo control. Esta disminución se aprecia en menor medida con el extracto diclorometánico (1,25 g de planta seca/kg de peso). Se utiliza como sustancia de referencia o patrón haloperidol (6 mg/kg). Se contabiliza el número de veces que introduce la cabeza en los orificios no valorándose aquellas realizadas consecutivamente en el mismo orificio. A los 30 minutos de la administración del extracto hidroalcohólico se produce una disminución significativa de la curiosidad manteniéndose hasta transcurridos los 120 minutos en el desarrollo de la prueba.

En la tabla 20 se encuentra reflejado el valor medio y la desviación estándar ( $p < 0,05$ ) del número de veces que el animal introduce la cabeza en el agujero. En la gráfica nº 6 se han representado los valores reflejados en la tabla 20

Tiempo (minutos)	Control	Patrón	Ext. Hid	Ext. Dic
30	47±24,39	3±1,58(*)	9,7±6,26(*)	32,2±8,8
60	74,6±17,3	1,6±1,8(*)	15,2±12,7(*)	22,6±5,6(*)
90	56,2±19,9	0,8±1,7(*)	16,0±8,4(*)	28,6±10,0(*)
120	59,2±19,9	1,2±1,3(*)	16,5±8,4	26,6±12,2

**Tabla 20:** Resultados obtenidos en el Test de Curiosidad, reflejándose los valores medios y la desviación estándar con respecto a la medias, del número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros (\*  $p < 0,05$ )



**Gráfica 6.-** Representación gráfica de los resultados obtenidos para el Test de la Curiosidad, Representándose los valores medios reales del parámetro recogido por el instrumental técnico empleado.

(\*  $p < 0,05$ )



### D.4.3.3 Test de la temperatura rectal

El extracto hidroalcohólico de la corteza administrado vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 g de planta seca/kg de peso, ocasiona una disminución de la temperatura rectal en los animales de experimentación, frente al grupo control.

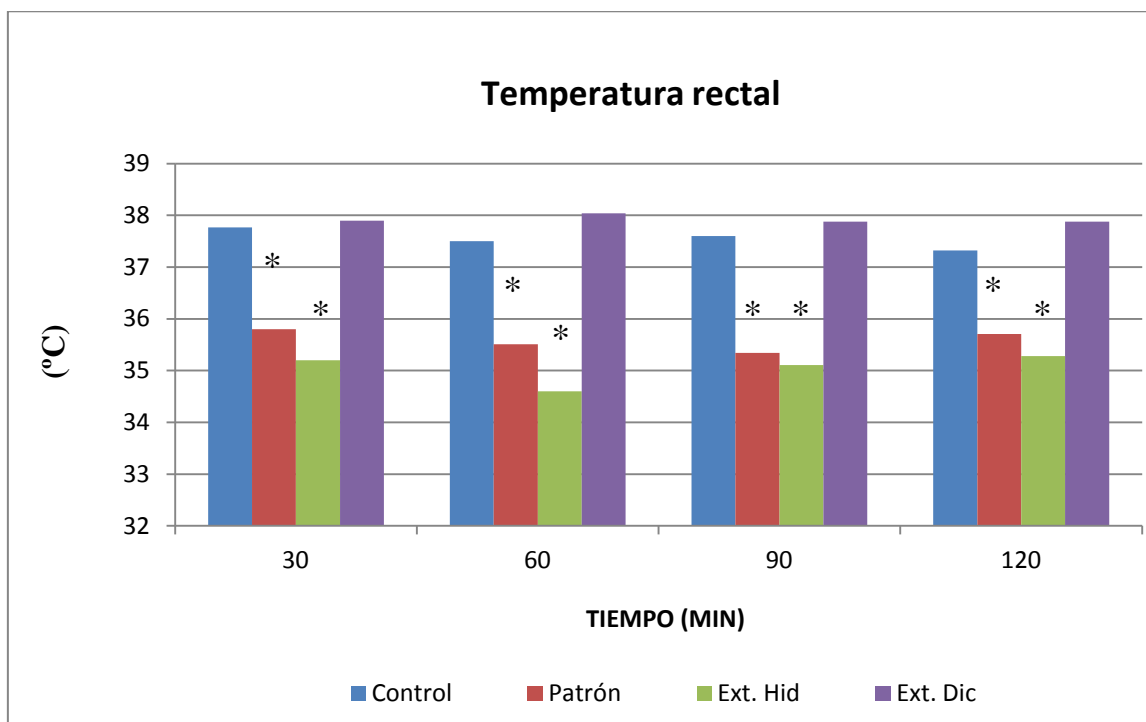
La temperatura rectal presenta un descenso a los 30 minutos que se mantiene hasta los 120 minutos siguiendo un comportamiento similar al del grupo patrón (haloperidol 6 mg/kg).

A la dosis ensayada con el extracto diclorometánico no se apreciaron variaciones en la medida de la temperatura en los animales tratados respecto al control.

En la tabla nº 21 se reflejan los valores de temperatura obtenidos para ambos extractos, junto con la desviación estándar y la significación estadística (\*)  $p < 0,05$  con respecto al grupo control. Del mismo modo, en la gráfica nº 7 se representa la variación de la temperatura respecto a los grupos control y patrón, así como la significación estadística correspondiente.

Tiempo (minutos)	Control	Patrón	Ext. Hid	Ext. Dic
30	37,77±0,22	35,88±1,02(*)	34,27±0,78(*)	37,92±0,40
60	37,58±0,34	35,51±1(*)	35,6±0,72(*)	38,04±0,13
90	37,65±0,39	35,34±0,41(*)	35,11±0,55(*)	37,88±0,19
120	37,32±0,44	35,71±0,28(*)	35,28±0,90(*)	37,88±0,21

**Tabla 21:** Resultados obtenidos en el test de la temperatura rectal. Se reflejan los valores medios de la variación de la temperatura rectal, junto con la desviación estándar y la significación estadística con respecto al grupo control. (\*  $p < 0,05$ )



**Gráfica 7:** Representación gráfica de los resultados obtenidos en el test de la Temperatura rectal. Se representan los valores medios de la variación de la temperatura respecto a los grupos control y patrón, así como la significación estadística correspondiente (\*  $P < 0,05$ )-.

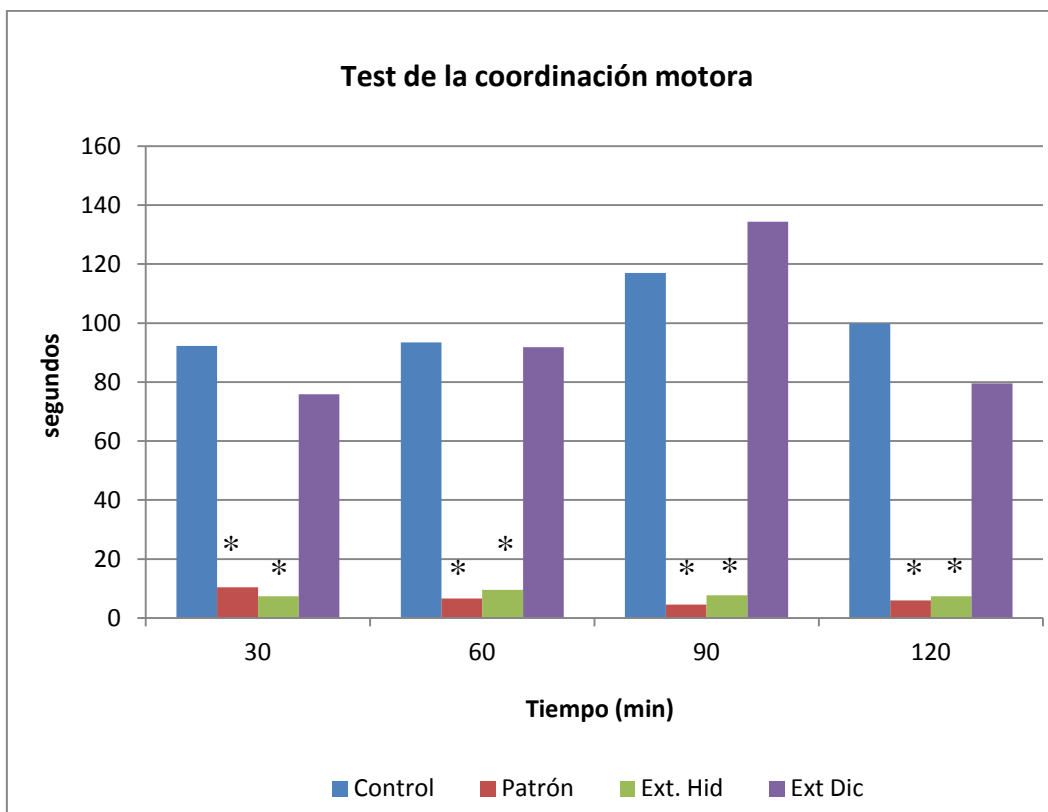
#### D.4.3.4 Test de la coordinación motora

El extracto hidroalcohólico de la corteza administrado vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 g de planta seca/kg de peso, ocasiona una disminución de la coordinación motora en los animales de experimentación, frente al grupo control. El descenso de la coordinación motora se mantiene a lo largo de toda la prueba y semejante al ocasionado por el patrón (haloperidol 6 mg/kg).

En la tabla nº 22 se reflejan los valores medios de la coordinación motora para ambos extractos, junto con la desviación estándar y la significación estadística (\*)  $p < 0,05$  con respecto al grupo control. En la gráfica nº 8 se representan los resultados reflejados en la tabla 22

Tiempo (minutos)	Control	Patrón	Ext. Hid	Ext. Dic
30	92,28±66	10,42±5,7(*)	7,42±2,37(*)	75,85±65,7
60	93,42±75,1	6,57±1,81(*)	9,57±5,3(*)	91,85±67,1
90	117±74,2	4,57±0,7(*)	7,71±2,7(*)	134,4±73,6
120	99,85±79,59	6±2,23(*)	7,42±3,86(*)	79,57±50,4

**Tabla 22:** Resultados obtenidos para el Test de la coordinación motora de los animales expresados en el tiempo (segundos) que el animal es capaz de mantenerse sobre un cilindro junto con la desviación estándar y la significación estadística con respecto al grupo control (\*)  $p < 0,05$



**Gráfica 8:** Representación gráfica para los resultados obtenidos en el test de la coordinación motora expresados en el tiempo (segundos) que el animal es capaz de mantenerse sobre un cilindro junto con la desviación estándar y la significación estadística con respecto al grupo control (\*)  $p < 0,05$

#### D.4.3.5 Sueño Inducido por Pentobarbital Sódico

El extracto hidroalcohólico de la corteza administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 g de planta seca/kg de peso ocasiona una disminución en el tiempo de la inducción al sueño, así como del tiempo de duración del mismo. El extracto diclorometánico a la dosis de 1,25 g de planta seca/kg de peso no acortó el tiempo de inducción al sueño, pero sí prolongó la duración del mismo.

En la tabla n° 23 se reflejan los efectos producidos por el extracto hidroalcohólico y diclorometánico, indicándose el tiempo medio de duración del mismo así como la desviación estandar y la significación estadística (\*)  $p < 0,05$  con respecto al grupo control.

TRATAMIENTO	DOSIS	TIEMPO DE INDUCCIÓN DEL SUEÑO (min)	TIEMPO DE DURACIÓN DEL SUEÑO (min)
CONTROL	60 mg pentobarbital sódico/kg de peso	$4 \pm (0,5)$	60,9
<i>Byrsonima crassifolia</i> (corteza)	0,5 g de extracto hidroalcohólico	$2,1 \pm (0,7)$	115,35(*)
	1,25 g de extracto diclorometánico	$6 \pm (1,2)$	65,6

**Tabla 23:** Resultados obtenidos para el tiempo de inducción al sueño. Se refleja el tiempo de inducción al sueño y el tiempo medio de la duración del mismo, (\*)  $p < 0,05$

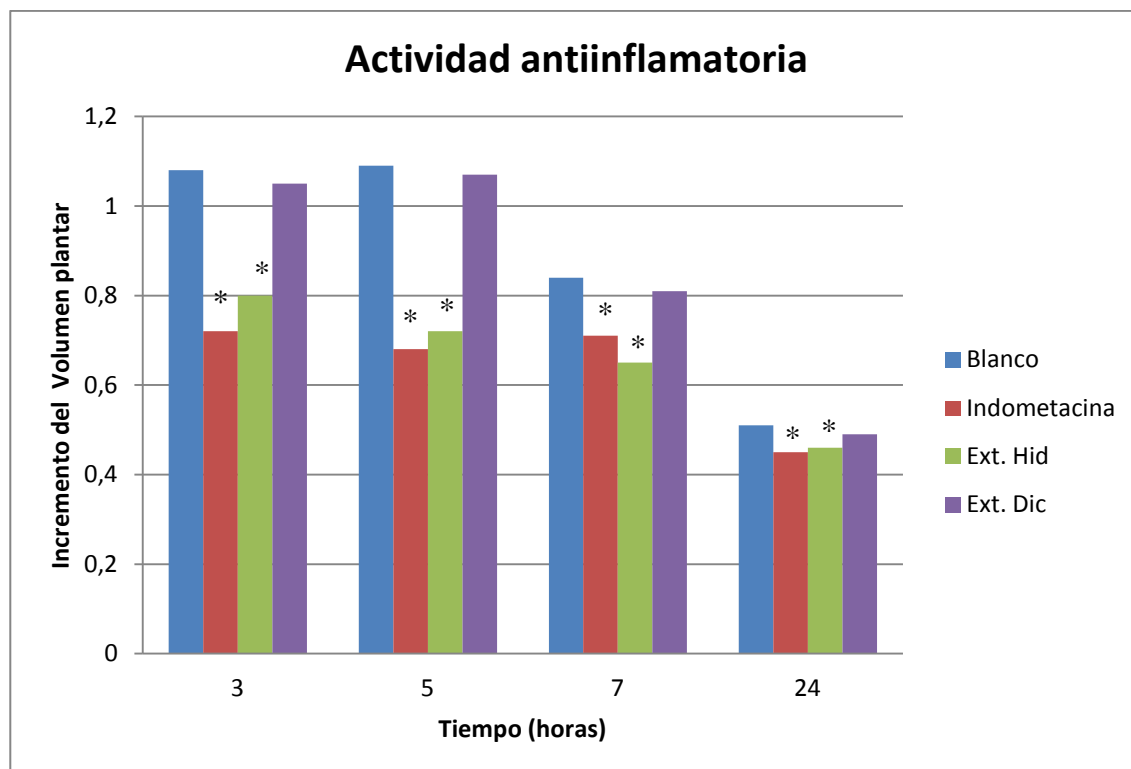
#### D.4.4 Otras pruebas farmacológicas generales

##### C.4.4.1 Actividad antiinflamatoria

El estudio de la actividad antiinflamatoria reveló que los extractos diclorometánico (1,25 g de planta seca/kg de peso) e hidroalcohólico (0,5 g de planta seca/kg de peso) administrados por vía intraperitoneal, provocan una disminución en el edema plantar a las 24 horas tras la administración del extracto hidroalcohólico provocado por la administración de carragenina en la aponeurosis plantar de rata. En la tabla 24 se recogen los resultados obtenidos para este ensayo

Tiempo (horas)	Control	Patrón (Indometacina 3 mg/kg)	Ext. Hid	Ext. Dic
3h	1,08±0,11	0,72±0,38(*)	0,8±0,25(*)	1,05±0,38
5h	1,09±0,12	0,68±0,48(*)	0,72±0,21(*)	1,07±0,61
7h	0,84±0,15	0,71±0,37(*)	0,65±0,44(*)	0,81±0,22
24h	0,51±0,14	0,45±0,21(*)	0,46±0,14(*)	0,49±0,12

**Tabla 24:** Resultados del estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos diclorometánico (1,25 g de planta seca/kg de peso) e hidroalcohólico (0,5mg de planta seca/kg de peso), utilizando como patrón indometacina (3 mg/kg de peso)



**Gráfica 9:** Estudio de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico y diclorometánico utilizando como patrón indometacina (3 mg/kg) representando el incremento del volumen plantar

#### C.4.4.2 Actividad analgésica

El estudio de la actividad analgésica se realizó, al igual que el resto de las pruebas farmacológicas, con los extractos diclorometánico e hidroalcohólico. Tras la administración de ambos extractos a la dosis de 1,25 y 0,5 g de planta seca/kg de peso, respectivamente por vía intraperitoneal, se observó un efecto analgésico en los animales tratados en los dos casos. Este efecto se aprecia a lo largo de toda la prueba.

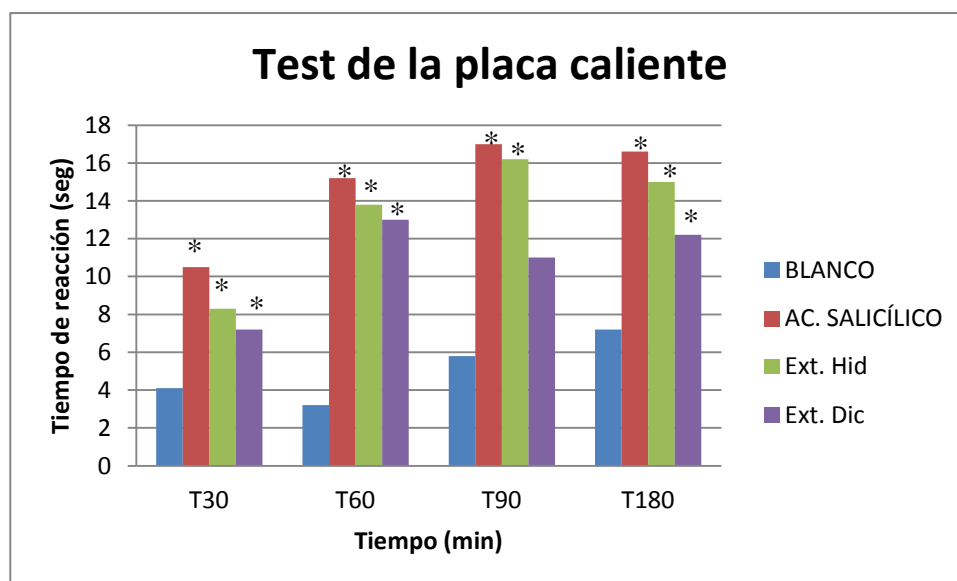
Si observamos el efecto analgésico producido por los extractos en estudio y lo comparamos con el producido por el ácido acetil salicílico como sustancia patrón (100 mg/kg de peso), podemos observar que tanto el extracto hidroalcohólico como el diclorometánico presenta una actividad analgésica a lo largo de toda la prueba tras la administración a los animales de experimentación.

En la tabla 25 se recoge el tiempo de reacción de analgesia para el ensayo de placa caliente y la representación gráfica en la gráfica 10

Tiempo (min)	Control	Patrón (Ácido acetil salicílico 100 mg/kg de peso)	Ext. Hid	Ext. Dic
30	4,1	10,5(*)	8,3(*)	7,2(*)
60	3,2	15,2(*)	13,8(*)	13(*)
90	5,8	17(*)	16,2(*)	11
180	7,2	16,6(*)	15(*)	12,2(*)

**Tabla 25:** Resultados obtenidos en el estudio de la actividad analgésica Test de la placa caliente de los extractos diclorometánico (1,25 g de planta seca/ kg de peso) e hidroalcohólico (0,5 g de planta seca/kg de peso), utilizando como patrón ácido acetil salicílico (100mg/kg de peso)





**Gráfica 10:** Representación de la media de los tiempos de reacción de los animales de experimentación a las distintas dosis ensayadas de los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de la corteza de *B. crassifolia* en el test de la placa caliente utilizando como patrón ácido acetil salicílico (100 mg/kg de peso)

## **D.5 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO**

El fraccionamiento del extracto diclorometánico se llevo a cabo mediante cromatografía flash en columna utilizando silicagel (Kieselgel 60, 40-60  $\mu\text{m}$ ), este soporte se escogió por sus buenos resultados en estudios previos.

Se eligió una columna de diámetro apropiado siguiendo las recomendaciones de Still et al., (1978), en ésta se colocaron 240 gramos de silicagel de tal forma, que su altura no fuera superior a cuatro veces el diámetro de la columna.

Para la adición de la muestra (4 gramos de extracto) se interpuso ésta en una cantidad adecuada de silicagel 60 depositada en la cabeza de columna.

### **D.5.1 Estudio previo mediante cromatografía en capa fina**

El inicio de una columna cromatográfica debe ser respaldado por un estudio en cromatografía en capa fina (CCF) por ser esta técnica fácilmente reproducible en el desarrollo de la columna cromatográfica propiamente dicha al comportarse como una columna abierta.

**Fase estacionaria:** silicagel F 1500/LS 254.

**Fases móviles:** El estudio cromatográfico se llevó a cabo seleccionando aquellas fases móviles más convenientes para la separación de los principales componentes químicos presentes en el extracto diclorometánico. En la tabla 26 se muestran las fases móviles utilizadas para el screening.

FASES MÓVILES	Diclorometano
	Hexano
	Acetato de etilo
	Tolueno
	Acetona
	Diclorometano/acetato de etilo (8:2)
	Metanol
	Tolueno/ Acetato de etilo (5:5)

**Tabla 26:** Fases móviles utilizadas para el seguimiento de las fracciones

**Revelador:** vainillina sulfúrica,

### D.5.2 Cromatografía en columna

El extracto fue disuelto en diclorometano por ser totalmente soluble y se sometió a cromatografía flash,

La muestra se disuelve en la fase móvil en un matraz de fondo redondo y se interpone esta disolución en la cantidad apropiada de silicagel 60 previamente desactivada con agua al 20 % p/v. Dicha disolución se deseca en rota-vapor a temperatura y presión controladas hasta que la fase estacionaria impregnada con la muestra adquiere en estado inicial y se desprende fácilmente de las paredes del matraz. La muestra, perfectamente interpuesta en la fase estacionaria, es depositada posteriormente en la cabeza de columna.

La columna fue eluida con las fases móviles previamente seleccionadas, recogiendo fracciones de 100 ml. La elución se inició con Diclorometano, seguida de Diclorometano/Acetato de etilo y finalmente Metanol.

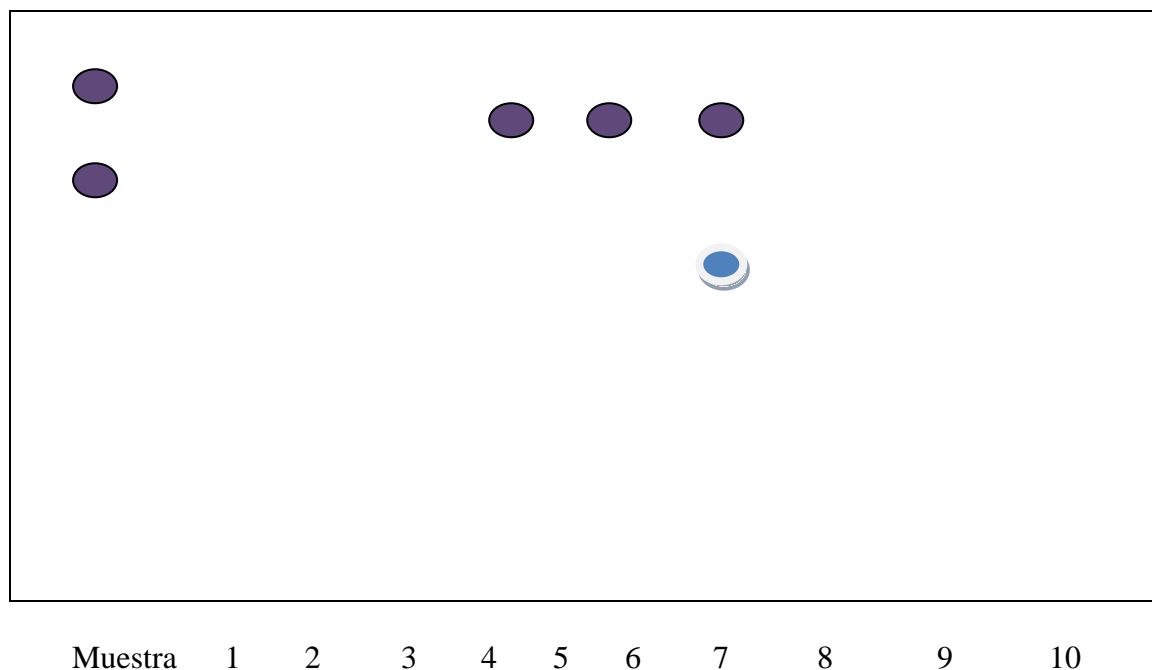
Posteriormente fueron agrupadas según su comportamiento cromatográfico en capa fina en la misma fase móvil

### D.5.3 Esquema del fraccionamiento del extracto diclorometánico

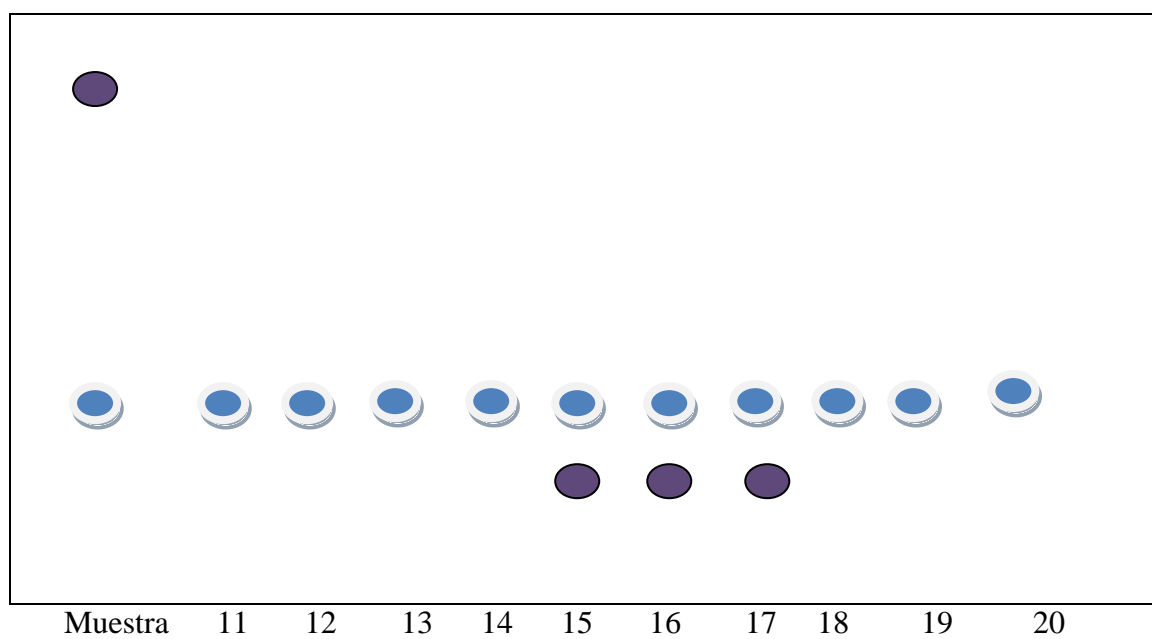
En la tabla 27 se expresan los diferentes disolventes utilizados para realizar la elución de las fracciones por polaridad creciente, así como los volúmenes empleados para dicho análisis.

Fracciones (100ml/fracción)	DISOLVENTES EMPLEADOS
1-10	DCM (1L)
11-20	DCM/Acetato de etilo (9:1) (1L)
21-30	DCM/Acetato de etilo (8:2) (1L)
31-40	DCM/Acetato de etilo (6:4) (1L)
40-50	metanol (1L)

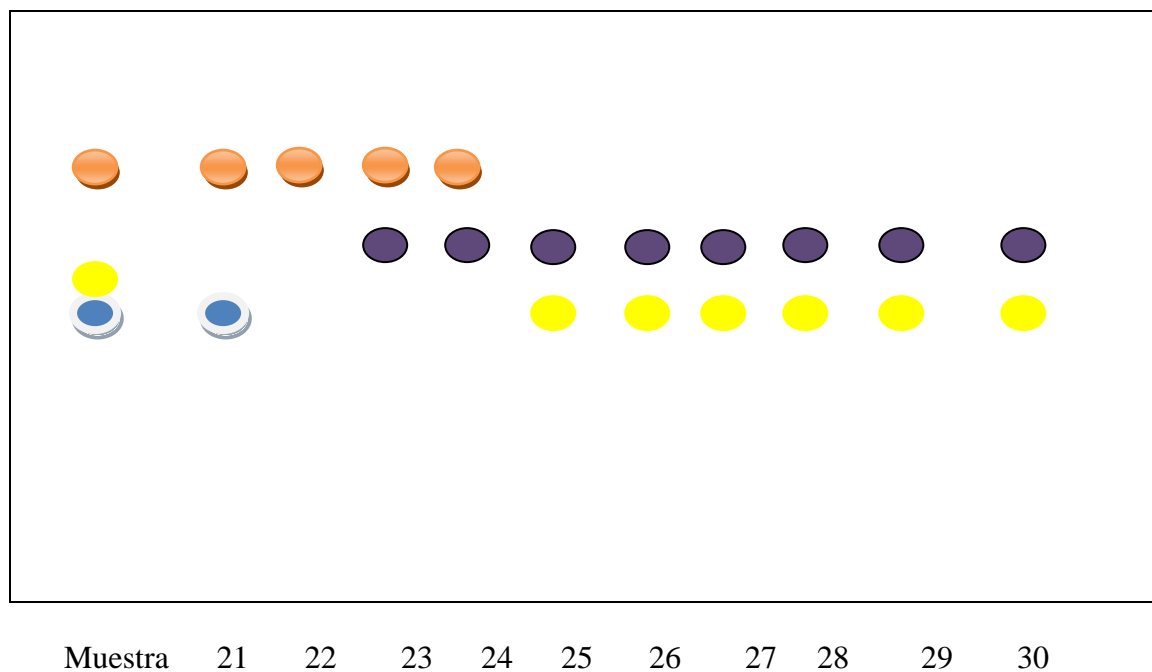
**Tabla 27:** Fases móviles utilizadas para el seguimiento de las fracciones



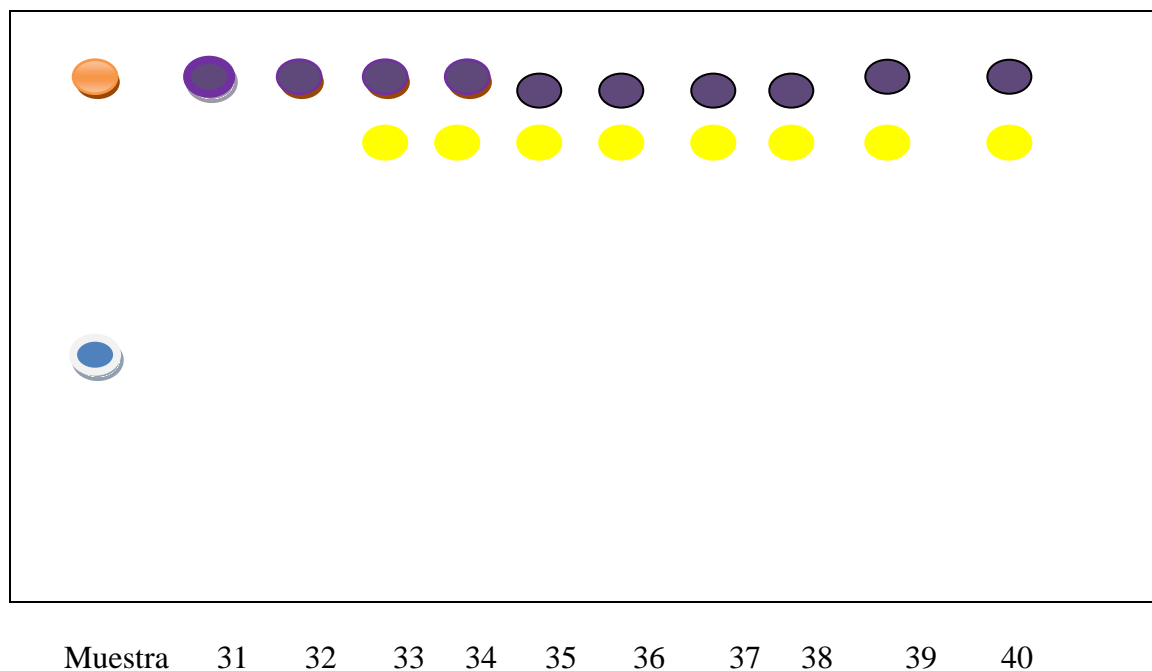
**Figura 5:** Fracciones 1-10 Fase móvil Diclorometano revelador vainillina sulfúrica observación bajo luz UV



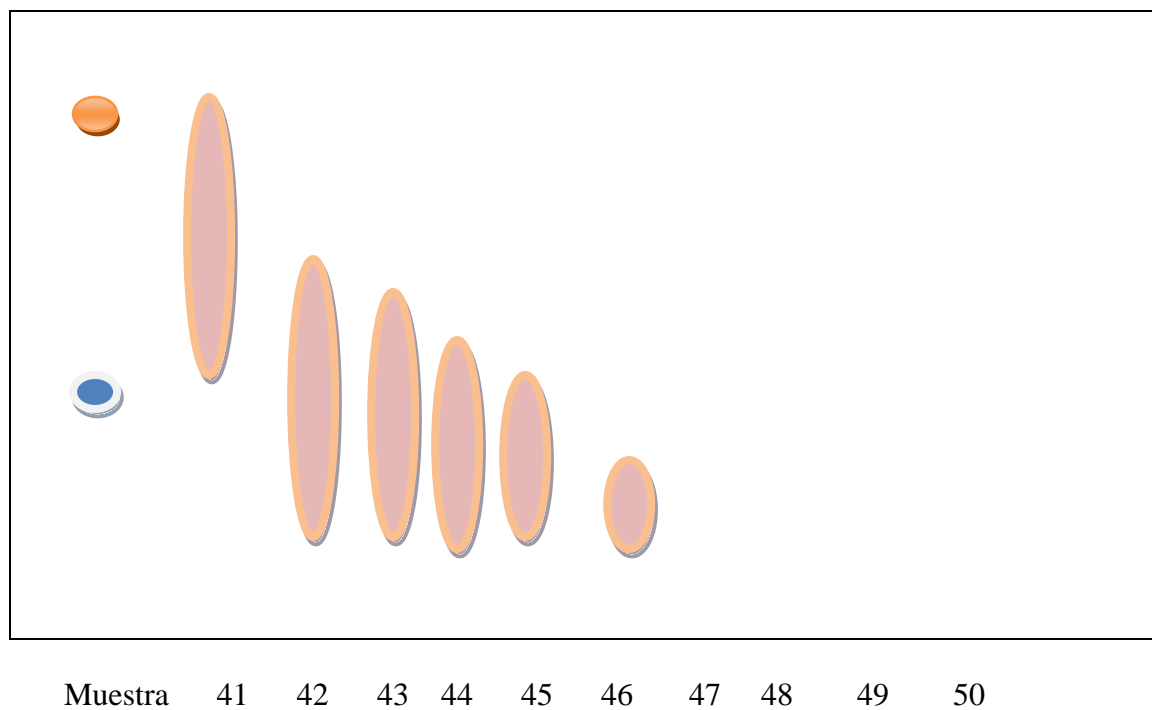
**Figura 6:** Fracciones 11-20 Fase móvil Diclorometano/ Acetato de etilo (9:1) y revelados vainillina sulfúrica



**Figura 7:** Fracciones 21-30 Fase móvil Diclorometano/ Acetato de Etilo (8:2) revelador vainillina sulfúrica



**Figura 8:** Fracciones 31-40 Fase móvil Diclorometano/ Acetato de Etilo (8:6), revelador vainillina sulfúrica



**Figura 9:** Fracciones 41-50 Fase móvil: Metanol, revelador vainillina sulfúrica.

Una vez fraccionado el extracto diclorometánico mediante cromatografía en columna y realizado el seguimiento por cromatografía en capa fina, se agruparon en 15 fracciones, que quedaron reducidas a 12.

En la tabla 28 se recoge el esquema del agrupamiento, la cantidad y el porcentaje de cada una.

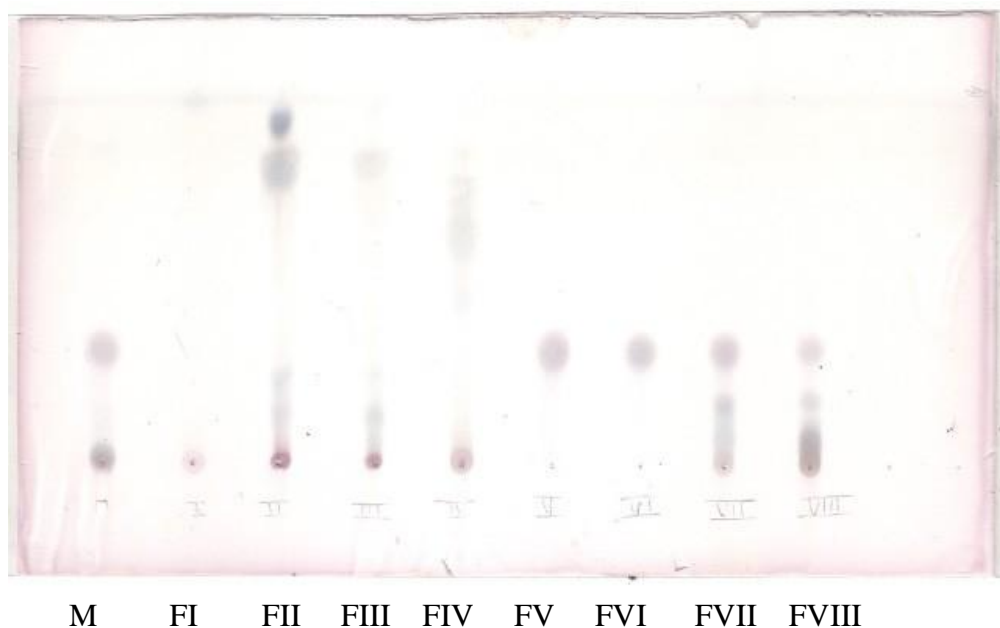
FRACCIONES	mg obtenidos	Rendimiento
FI	1	0,025 %
FII	123	12,3 %
FIII	34	3,4 %
FIV	6	0,85 %
FV	2	0,05 %
FVI	265	6,62 %
FVII	277	6,92 %
FVIII	99	2,47 %
FIX	80	2 %
FX	30	0,75 %
FXI	11	0,27 %
FXII-FXIII-FIV-FV	280	7 %
TOTAL	3.206 GRAMOS	

**Tabla 28:** Fracciones obtenidas y cantidad de cada una de ellas junto con el rendimiento junto con los mg pesados de cada una de ellas.

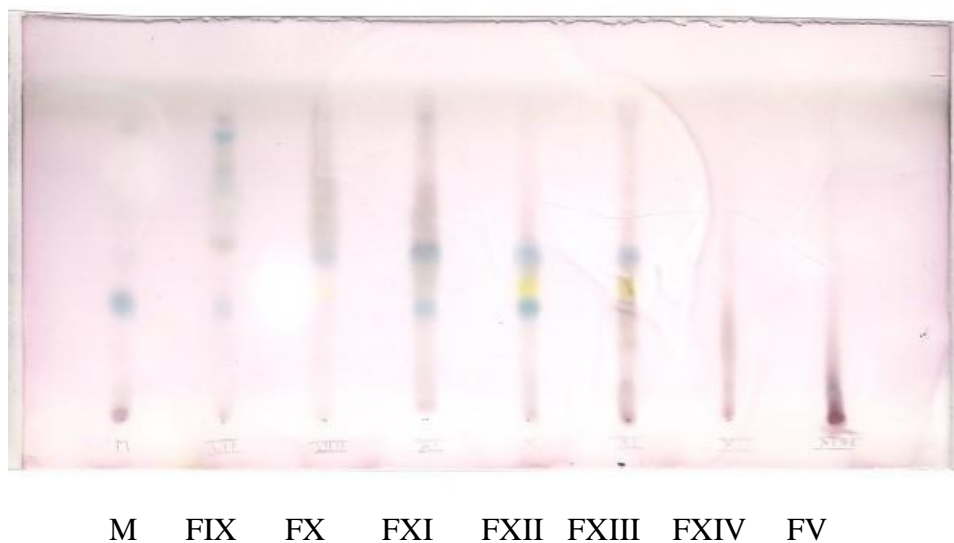
Estudiadas las fracciones obtenidas a partir del extracto mediante CCF y el revelador vainillina sulfúrica, pudimos aventurar que en la fracción quinta existía un compuesto aislado.

A continuación en las figuras 10 y 11 se representa el comportamiento cromatográfico de las 15 fracciones obtenidas.





**Figura 10:** Cromatografías de las fracciones obtenidas tras su paso por la columna cromatográfica. Fase móvil: Diclorometano/acetato de etilo (8:2), revelador: vainillina sulfúrica.



**Figura 11:** Cromatografías de las fracciones obtenidas tras su paso por la columna cromatográfica. Fase móvil: Diclorometano/acetato de etilo (6:4), revelador: vainillina sulfúrica.

En la fracción V se observa una mancha de Rf 0,40 idéntica a la aparecida en el extracto inicial

#### D.5.4 Identificación de compuestos

Se obtuvieron doce fracciones (I-XII) que fueron concentradas en rotavapor con control de temperatura y apreciándose en la fracción V un compuesto aislado. Para su elucidación estructural se emplearon diferentes técnicas.

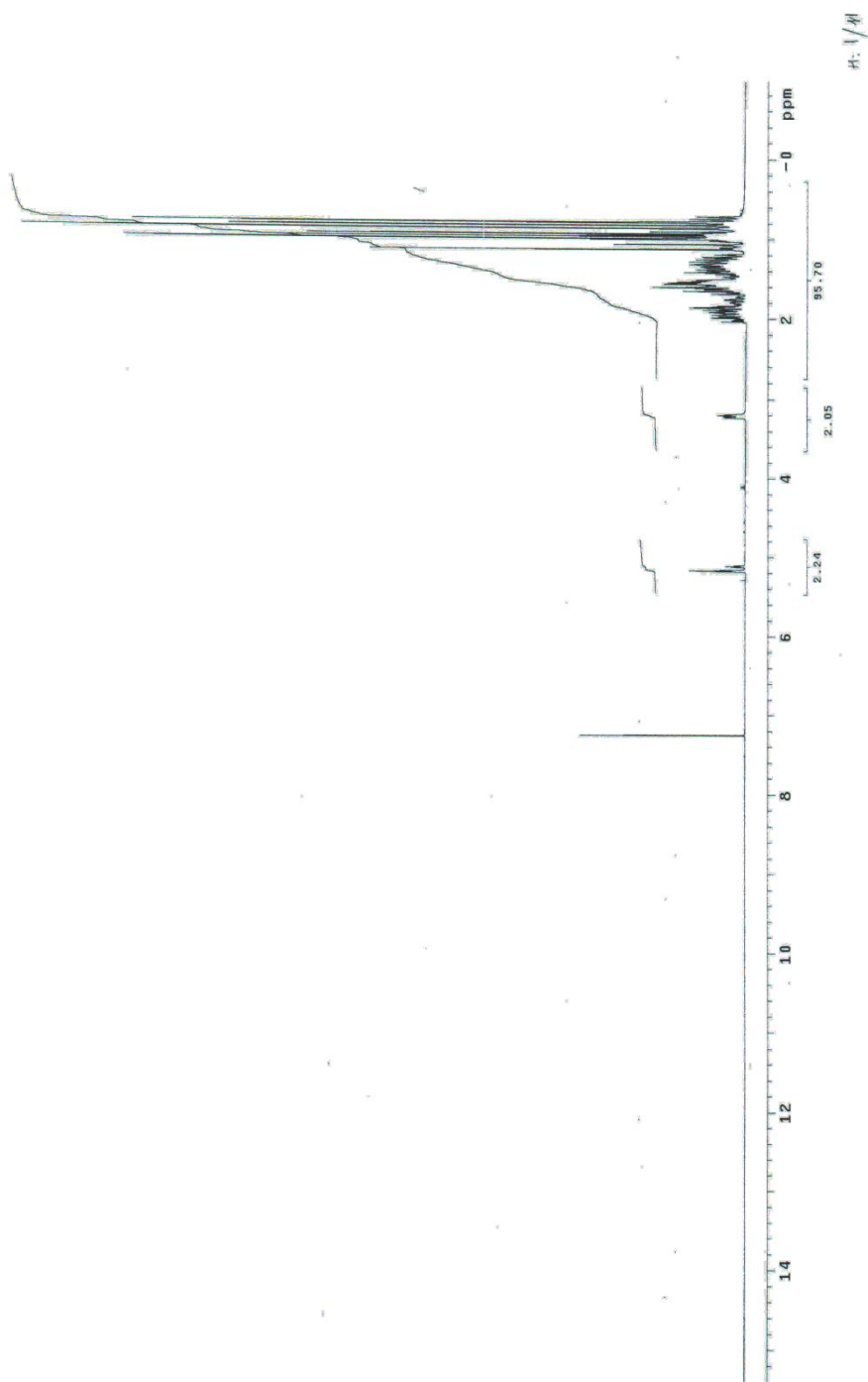
Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ -RMN

Espectrometría de Masas (MS)

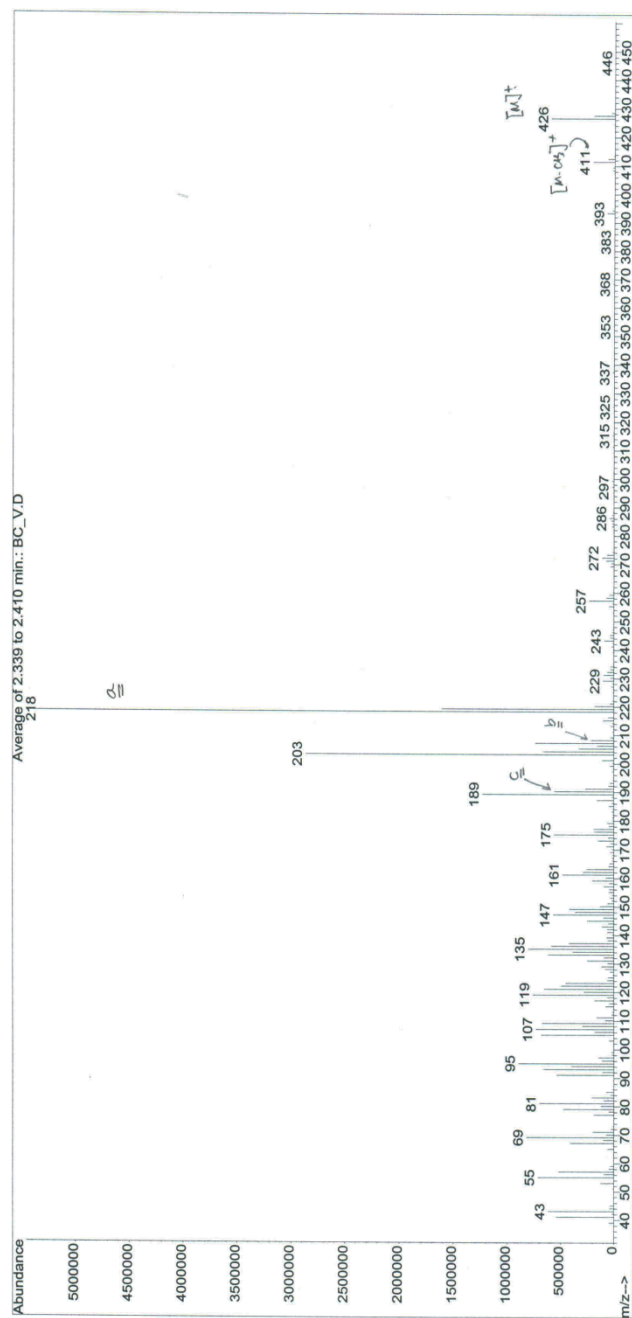
En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se obtuvieron dos señales a  $\delta$  5,17 (t,  $J=3,6$  Hz) (75% de 1H) y  $\delta$  5,12 (t,  $J=3,6$  Hz) (25% de 1H). Se obtuvo otra señal a  $\delta$  3,21 81H, dd.  $J = 11,2$  y  $4,7$ ) que es característica de triterpenos con un  $3\beta\text{-OH}$  y ha de asignarse al protón axial H-3 $\alpha$ .

Se observaron ocho señales intensas que corresponderían a los ocho metilos de un compuesto oleano y otras seis señales de menor intensidad también correspondientes a metilos todos ellos atribuidos a un esqueleto de ursano.

Una vez analizados los espectros se concluyó que al compuesto aislado correspondía a una mezcla de dos isómeros:  $\alpha$  y  $\beta$  amirina .



**Figura 12:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}$ ) de la fracción V



**Figura 13:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (75 MHz, DMSO +  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la fracción V

## D.6 AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

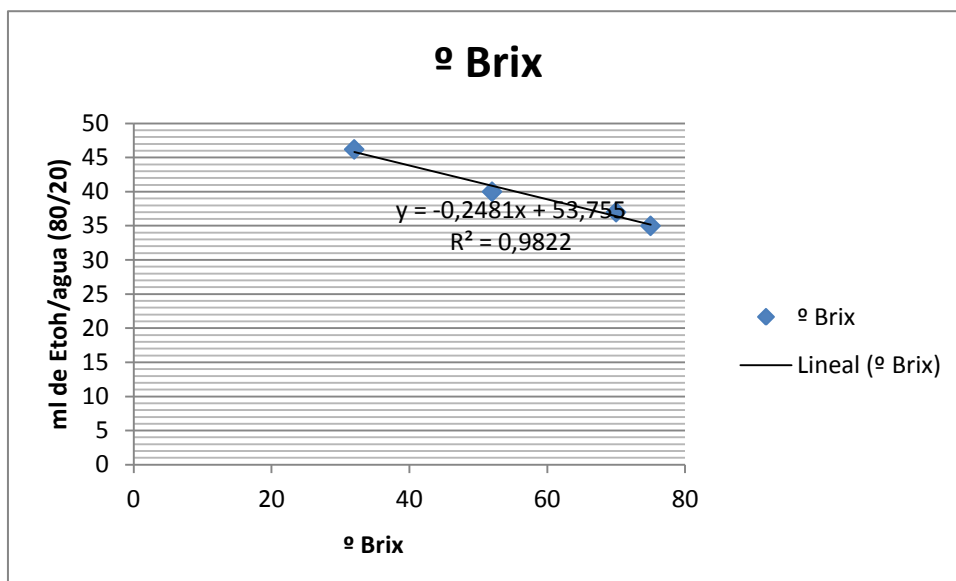
### D.6.1 Restitución

Tras la obtención de los dos extractos (EA, EH) procedentes del extracto hidroalcohólico con el fin de determinar la concentración con la que se trabaja en los diferentes análisis se realiza una recta de calibrado relacionando los °Brix (sólidos solubles) con la concentración expresada en g/ml.

En la tabla 29 se recogen las equivalencias existentes entre el extracto en estudio y los °Brix presentes en las muestras diluidas con Etanol/Agua (80;20) en la gráfica 11 se representa la recta de calibrado.

Ml de EtOH/ H <sub>2</sub> O (80:20)	°Brix
32	46,2
52	40
70	37
75	35

**Tabla 29:** Recta de Calibrado relacionando °Brix con ml de etanol/agua ( 80:20)



**Gráfica 11:** Representación gráfica de la recta de calibrado

#### D.6.1.1 Porcentaje de humedad, pH y acidez total

Los resultados obtenidos tras determinar la humedad por el método de pérdida de peso por desecación en estufa se reflejan en la tabla 30. Las mediciones se realizan hasta obtener peso constante. Como puede observarse se produjo pérdida de humedad considerable. Se ve representado el porcentaje en masa en la tabla 31.

	sin muestra	con muestra (1 ml)	Desecado
Muestra	(Peso 1)	(Peso 2)	(Peso 3)
EA	35,022	36,040	35,202
EH	34,230	35,282	34,417

**Tabla 30:** Resultados del ensayo de determinación de humedad en las muestras EA y EH

MUESTRAS	% Humedad
EA	17,6%
EH	20%

**Tabla 31:** Porcentaje de humedad de los extractos Hidroalcohólico y Acuosos

La acidez de los extractos se expresa como contenido total de todos los ácidos y se refiere al ácido tartárico (g/l tartárico). Se llevó a cabo la determinación del pH y acidez, los resultados se recogen en la tabla 32.

MUESTRAS	pH	g/l tartárico
EA1	5,34	0,13596
EA2	5,32	0,13185
EH1	6,37	0,01202
EH2	6,39	0,01354

**Tabla 32:** Determinación de la Acidez expresados los resultados en g/l ac. tartárico

#### D.6.1.2 Compuestos polifenólicos

La extracción de los polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Folin Ciocalteu (FC) descrito por Georgé et al. (2005). Los reactivos utilizados fueron la solución acetona/agua (7/3 v/v), solución de carbonato de sodio ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ), solución de Folin (diluida en 10 partes de agua), ácido gálico ( $5 \text{ mg/L}$  a  $25 \text{ mg/L}$ ).

Una vez obtenidos se procedió a su identificación mediante HPLC determinando los principales constituyentes de la muestras. En la tabla 33 se recogen los valores obtenidos de polifenoles totales (g/l ácido gálico)

MUESTRAS	g/l ácido gálico
EA1	0,1468
EA2	0,1579
EH1	0,0574
EH2	0,0892

**Tabla 33:** Determinación de las polifenoles totales expresados los resultados en g/l ac. gálico

### D.6.1.3 Taninos condensados totales

En la tabla 34 se muestran los resultados obtenidos expresados en mg/l de procianidinas

MUESTRAS	Medidas	Absorbancia	Concentracion mg/l procianidinas
EA1	Medida 1	0,145 nm	0,029
	Medida 2	0,116 nm	
EA2	Medida 1	0,082 nm	0,017
	Medida 2	0,099 nm	
EH1	Medida 1	0,156 nm	0,025
	Medida 2	0,131 nm	
EH2	Medida 1	0,177 nm	0,027
	Medida 2	0,150 nm	

**Tabla 34:** Concentración de taninos condensados totales expresados en mg/l procianidinas



#### D.6.1.4 Identificación de fenoles mediante HPLC

La elución en fase normal se produce en orden creciente de masas moleculares: los primeros picos del cromatograma con tiempo de retención entre los minutos 5 y 10 corresponden al conjunto de prtocatéquicos y otras moléculas de tamaño semejante, el rango desde el minuto 23 hasta el 36 corresponde a las catequinas; a partir del minuto 24 empiezan a aparecer los trímeros intercalados con algunos dímeros galoilados; la región desde el minuto 30 hasta el 37 es donde se encuentran intercalados varios tetrameros no galoilados y más tarde galoilados y algunos trímeros galoilados.

Tras un inyección directa del extracto en la tabla 35 se recogen los resultados obtenidos y la concentración de los diferentes fenoles presentes en la muestra (EA). En la figura 14 se representa el cromatograma obtenido para dichos resultados

Cromatógrafo líquido de alta eficacia: Waters

Bomba: Waters 600

Horno: Waters TCM 060 M, T<sup>a</sup> 30°C

Procesador de datos: Waters 717 plus

Detector: Photodiode Array Waters 2996

Longitud de onda: 220-360 nm.

Fase estacionaria: Nova-Pak C<sub>18</sub> 60 A, 4μm 3,9 x 300 mm WAT 011695.

Fase móvil: A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (98:2)

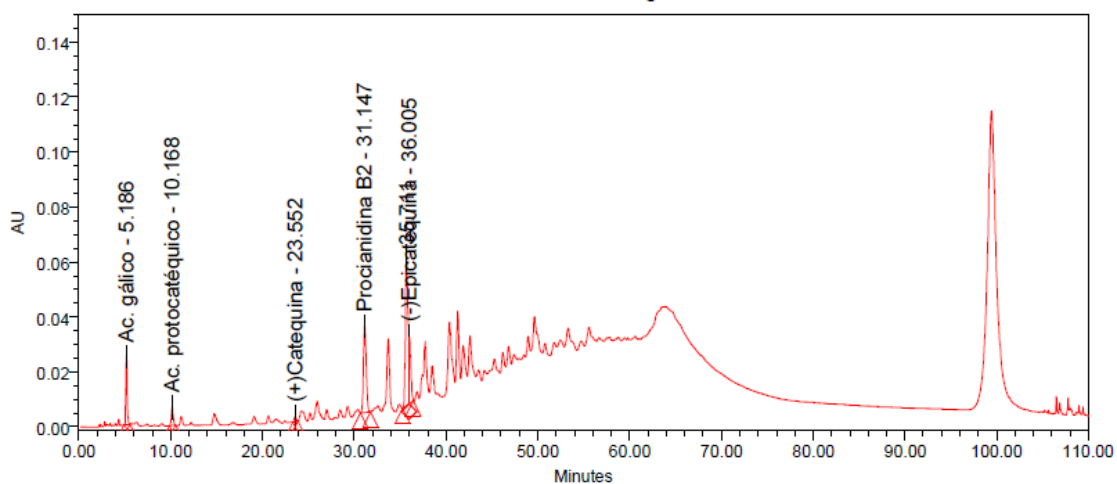
B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH/ CH<sub>3</sub>CN (78:2:20)

C: CH<sub>3</sub>CN

Flujo: 1-1,2 ml/min

Fenoles	Tiempo de retención (min)	Area	Concentración(mg)
Ac. gálico	5.186	242962	
Ac. protocatéquico	10.168	92704	0,00009269
Procianidina B1			
(+)Catequina	23.552	28315	0,0001013
Procianidina B2	31.147	657494	0,0012004
(-)Epicatequina	36.006	274754	0,000495

**Tabla 35:** concentraciones de los diferentes compuestos fenólicos, así como las concentraciones obtenidas de cada uno de ellos.



**Figura 14:** Inyección directa del EA

### **D.6.2 Eliminación de complejos macromoleculares**

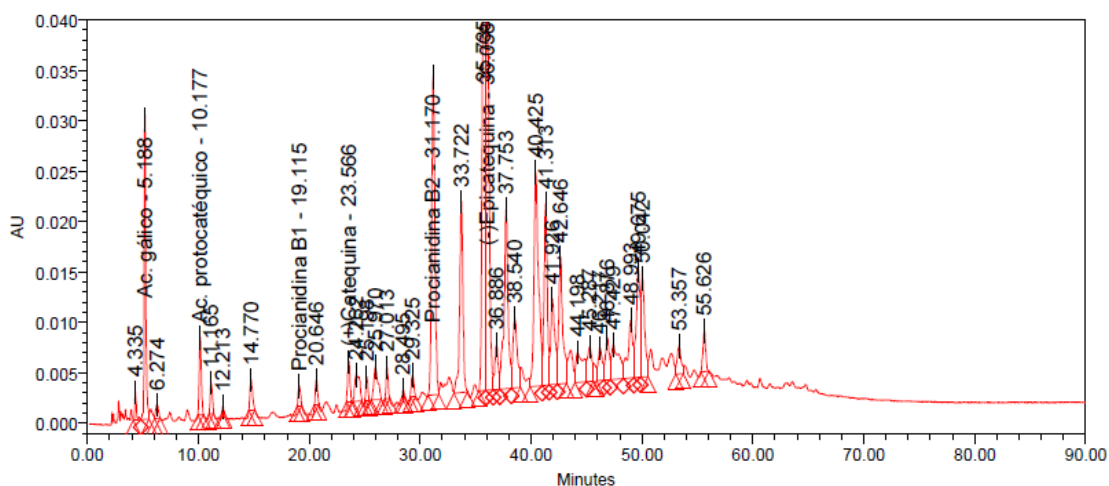
Para la separación de la fracción macromolecular (polimérica), de los extractos, se ensayaron membranas de varios tamaño de poro para una separación molecular y de diversos materiales. La máxima separación de la fracción macromolecular y la mínima retención de compuestos fenólicos de bajo peso molecular se consiguió con las membranas de entre 30 y 10 kDa de tamaño de poro por lo que fueron utilizadas para el estudio.

Tras la eliminación de complejos macromoleculares por un membrana de tamaño de corte de 30 kDa obteniéndose un permeado P1 determinándose su composición fenólica por HPLC. La tabla 36 recoge los valores obtenidos de las concentraciones de los diferentes fenoles y se representa el cromatograma en la figura

15

Fenoles	Tiempo de retención (min)	Area	Concentración (mg)
Ac. gálico	5.198	162235	
Ac. protocatéquico	10.136	91230	0,00009183
Procianidina B1	20.691		
(+)Catequina	23.439	140913	0,00026078
Procianidina B2	30.873	306158	0,00067291
(-)Epicatequina	35.753	1047655	0,00159002

**Tabla 36:** concentraciones de los diferentes compuestos fenólicos en P1, así como las concentraciones obtenidas de cada uno de ellos.

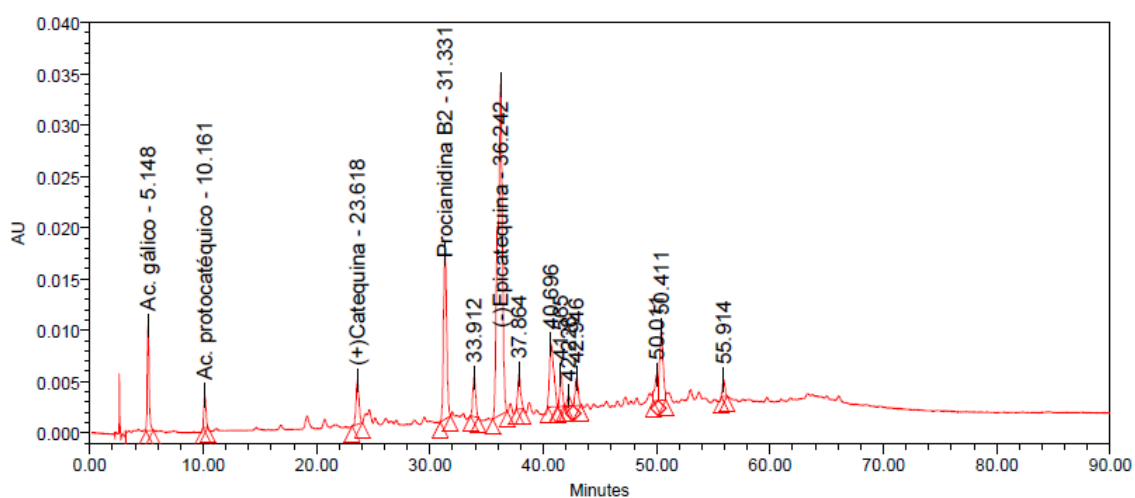


**Figura 15:** Inyección permeado por una membrana de tamaño de corte de 30 Kda.

Tras la eliminación de complejos macromoleculares por una membrana de tamaño de corte de 10 kDa se obtiene un permeado (P2). La tabla 37 se recogen los valores obtenidos en con las concentraciones de los diferentes fenoles y se representa el cromatograma en la figura 16.

Fenoles	Tiempo de retención	Area	Concentración (mg)
Ac. gálico	5.148	117505	
Ac. protocatéquico	10.161	39993	0,0000697
Procianidina B1	20.691		
(+)Catequina	23.618	78895	0,0001729
Procianidina B2	31.331	317609	0,0006901
(-)Epicatequina	36.240	667520	0,00105158

**Tabla 37:** concentraciones de los diferentes compuestos fenólicos, así como las concentraciones obtenidas de cada uno de ellos.



**Figura 16:** Inyección permeado por una membrana de tamaño de corte de 10 Kda.

### D.6.3 Estudio farmacológico

La distintas fracciones se estudiaron a nivel del Sistema Nervioso Central para comprobar si seguían presentando actividad farmacológica los permeados obtenidos tras la eliminación de los complejos macromoleculares. En la tabla 38 se reflejan los resultados obtenidos tras la eliminación de los complejos macromoleculares de la muestra.

TRATAMIENTO	DOSIS	TIEMPO DE INDUCCIÓN DEL SUEÑO (segundos)	TIEMPO DE DURACIÓN DEL SUEÑO (segundos)
CONTROL	<b>60 mg pentobarbita sódico/Kg de peso</b>	<b>4±(0,5)</b>	<b>60,9</b>
EA	<b>0,5 g de extracto</b>	<b>2,3±(0,4)</b>	<b>117,35(*)</b>
P1 (30 kda)	<b>0,5 g de extracto</b>	<b>2,9±(0,5)</b>	<b>160,27(*)</b>
P2 (10 kda)	<b>0,5 g de extracto</b>	<b>3,9±(0,9)</b>	<b>199,67(*)</b>

**Tabla 38:** Tiempo de inducción al sueño.y duración del mismo \* p<0,05

## **E. DISCUSIÓN**

Los estudios preliminares a la validación farmacológica del empleo popular de plantas medicinales son fundamentales en cuanto que orientan la investigación hacia un tipo de actividad en concreto, con el objetivo de un posterior aislamiento e identificación de los compuestos, búsqueda de nuevos principios activos y estudio del mecanismo de acción de los mismos.

Dentro de la participación en el Proyecto CYTED y como continuación de trabajos anteriores, que supusieron un punto de inicio en el estudio farmacológico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. hemos abordado el estudio en profundidad de esta especie vegetal y su efecto a nivel del Sistema Nervioso Central.

En este sentido, ensayos previos realizados con la planta objeto de esta tesis doctoral, permitieron demostrar que el extracto acuoso de la corteza presentaba actividad a nivel de Sistema Nervioso Central, concretamente se observaron efectos en el comportamiento: disminución en la actividad motora y relajación muscular general, piloerección y ptosis palpebral; así mismo, redujo las respuestas inducidas al sonido y al tacto. El estudio de las hojas puso también de manifiesto que el extracto acuoso obtenido a partir de las mismas presentaba actividad aunque menos marcada (Morales Cifuentes 2001).

Tomando como punto de partida los estudios anteriormente mencionados, en este trabajo de tesis doctoral se ha abordado el estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos hidroalcohólico y diclorometánico de *B. crassifolia*. Se ha realizado un screening fitoquímico en cromatografía en capa fina para poner de manifiesto los principales grupos químicos presentes en los extractos. Se comprobó la existencia de aceites esenciales, triterpenos y saponinas en el extracto diclorometano y taninos y triterpenos en el extracto hidroalcohólico

Desde el punto de vista farmacológico, se desarrollaron inicialmente pruebas para determinar la toxicidad de ambos extractos "in vivo" estableciendo la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>). Así se determinó la dosis adecuada para las posteriores investigaciones. El extracto diclorometánico no presentó toxicidad por lo que se estableció como dosis experimental, de acuerdo al proyecto CYTED 1,25 g/Kg de peso; en cuanto al extracto hidroalcohólico, la DL<sub>50</sub> fue de 1,5 g/kg de peso, estableciéndose como dosis en el



estudio en animal de experimentación, 0,5 g de planta/ kg (1/3 de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>). Estas dosis se utilizaron en las pruebas neurofarmacológicas posteriores.

El método de screening inicial elegido para el estudio ha sido el Test de Irwin por tratarse de un test multidimensional que aporta múltiples datos sobre la actividad neurofarmacológica de la droga en estudio. Con el fin de realizar una puesta a punto exhaustiva de este test se realizó inicialmente con una serie de sustancias patrones, con clara actividad sobre los distintos parámetros estudiados en el mismo. Una vez identificados cada uno de los efectos correspondientes a dichas sustancias, se pasó a la realización del test sobre los extractos diclorometánico e hidroalcohólico obtenidos a partir de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.

Tras la realización del test de Irwin, en las pruebas realizadas con el **extracto hidroalcohólico** se detectó una gran disminución de la actividad espontánea y de la reactividad así como una clara disminución del tono muscular a la 1/2 hora tras la administración del extracto, también es considerable la reducción del ritmo respiratorio a lo largo de toda la prueba. El efecto depresor mostrado tras la administración de 0,5 g/kg del extracto hidroalcohólico se manifestó en una disminución de la actividad motora (actividad espontánea, reactividad y respuesta al tacto), datos que serían coherentes con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Morales Cifuentes 2001).

Los resultados obtenidos en el test de Irwin para el extracto diclorometánico demuestran una pequeña disminución de la actividad espontánea hasta las 3 horas tras la administración del extracto.

La actividad sedante mostrada mediante el Test de Irwin determinó la realización de una serie de ensayos sobre SNC con el objeto de confirmar esta actividad. De esta forma se llevaron a cabo una serie de test con el propósito de poner de manifiesto la posible actividad sedante y relajante observada. Para ello, se realizaron sobre ambos extractos los test de actividad motora espontánea, coordinación motora, temperatura rectal, curiosidad y sueño inducido por pentobarbital sódico, utilizando siempre en los estudios sustancias patrón de actividad conocida con las que se pudieran comparar los resultados.

Con objeto de completar el estudio farmacológico se realizaron ensayos de actividad analgésica y actividad antiinflamatoria. Se pudo comprobar un efecto antiinflamatorio a las 7 horas tras la administración del extracto hidroalcohólico siendo duradero dicho efecto transcurridas 24 horas. El extracto hidroalcohólico produjo una disminución del dolor a lo largo de toda la prueba poniendo de manifiesto una actividad analgésica en los animales de experimentación.

#### 1º.- Extracto Diclorometánico

El porcentaje de disminución de la actividad motora espontánea observado en los animales tratados no fue significativo con respecto al grupo control a lo largo de toda la prueba. La disminución de la actividad exploratoria de los animales de experimentación en el test de la curiosidad demostró ser estadísticamente significativa a los 120 minutos. La temperatura rectal se mantuvo constante, midiéndose a diferentes intervalos de tiempo no se obtuvo variación con respecto al grupo control. Tras la realización del test de coordinación motora no se obtuvo ninguna variación significativa. En el estudio de sueño inducido por pentobarbital sódico no se observó actividad de este extracto, lo que confirma los datos obtenidos en pruebas preliminares.

#### 2º Extracto Hidroalcohólico

El porcentaje de disminución de la actividad motora espontánea fue significativo para el extracto hidroalcohólico, disminuyendo ésta progresivamente hasta llegar incluso a un 60,9% frente al grupo patrón, manteniéndose este efecto en el tiempo hasta 90 minutos tras la administración del extracto. Tras la realización del test de la curiosidad se determinó una disminución de la curiosidad a lo largo de toda la prueba. La temperatura rectal de los animales de experimentación presentó un descenso significativo a los 30 minutos. El test de coordinación motora corroboró los resultados anteriormente obtenidos presentando una disminución de la misma a lo largo de toda la prueba y siendo estadísticamente significativa. Este efecto sedante se vio confirmado en el sueño inducido por pentobarbital sódico, observándose en los animales tratados con el extracto un tiempo menor de inducción al sueño con respecto al grupo control, produciéndose además una mayor duración del mismo.

Se llevaron a cabo pruebas para determinar la acción analgésica y antiinflamatoria en los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de la corteza de *B. crassifolia* con el fin de completar el estudio farmacológico, se comprobó estos efectos siendo más marcados para el extracto hidroalcohólico.

Una vez confirmado el efecto sedante del extracto hidroalcohólico de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. procedimos al estudio exhaustivo de la composición química del mismo, estudiando también el extracto diclorometánico. Habiéndose descrito la existencia de compuestos fenólicos en dicho órgano de la planta (Béjar et al., 2000), nos inclinamos a pensar que el efecto mostrado podría ser debido a los mismos y ésta fue nuestra hipótesis de partida, avalada por diversos estudios experimentales en los que se describen compuestos fenólicos como responsables del efecto depresor de *B. crassifolia* a nivel del SNC. Este podría ser debido, al menos en parte, a compuestos fenólicos como la catequina y la procianidina B2 (epicatequin (4 $\beta$ →8) epicatequina), (Ding, L.A et al., 1990; Jensen, A.G et al., 2001; Campbell, E.L et al., 2004; Adachi, N et al., 2006; Vignes, M et al., 2006; Rocha, F.F et al., 2007).

El estudio del extracto diclorometánico se llevó a cabo mediante un fraccionamiento por cromatografía flash en columna (Still et al., 1978). Previamente se realizó un estudio mediante cromatografía en capa fina para determinar las fases móviles más adecuadas para llevar a cabo el desarrollo de la columna cromatográfica. En el estudio de las diferentes fracciones empleamos también la cromatografía en capa fina, que es la técnica de elección en el seguimiento de los compuestos presentes en las fracciones por su rapidez y sencillez.

Tras la incorporación de la muestra se eluyó sucesivamente con diclorometano, diclorometano/acetato de etilo (9:1,8:2,6:4) finalizando con metanol. El seguimiento de las fracciones se realizó como hemos indicado mediante cromatografía en capa fina revelándose todas las placas con vainillina sulfúrica como revelador universal. Se recogieron un total de XV fracciones que se reagruparon en XII según su comportamiento cromatográfico.

La fracción V presentó una cristalización y para la elucidación estructural de compuestos se realizaron los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -

RMN. Se observaron ocho señales intensas que corresponderían a los ocho metilos de un compuesto oleano y otras seis señales de menor intensidad también de metilos todos ellos atribuidos a un esqueleto de ursano. Una vez analizados los espectros se concluyó que el compuesto aislado correspondía a una mezcla de dos isómeros:  $\alpha$  y  $\beta$  amirina.

En una segunda etapa del trabajo, se realizó el estudio del extracto hidroalcohólico. Llevándose a cabo una cuantificación de los taninos condensados totales determinando una alta concentración de los mismos.

La determinación de los polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Folin Ciocalteau descrito por Georgé et al., 2005, expresando los resultados en g/l de ácido gálico, comprobamos que la muestra presentaban una elevada concentración de los mismos.

Como paso final se procedió al estudio de compuestos fenólicos presentes en el extracto. Debido a la dificultad que presenta la separación de compuestos fenólicos en presencia de complejos macromoleculares se realizó la eliminación de éstos, realizando para ello una purificación por membranas de diferente tamaño de poro para una separación por su peso molecular. Se emplearon membranas de diámetro de poro de 30 y 10 KDa. Se obtuvieron así dos permeados (P1 y P2). El primero de ellos (30 KDa) incluye los componentes de peso molecular mayor, mientras que el segundo (10 KDa) los de peso molecular menor.

Las fracciones obtenidas a partir de los permeados se sometieron a análisis por HPLC, empleando para ello fase reversa, columna Nova-Pak C<sub>18</sub> 60 A, con una tamaño de partícula de 4 $\mu$ m y 3,9 diámetro interno y 300 mm de longitud; el flujo de elución fue constante (1-1,2 ml/min). El tiempo de análisis fue de 90 minutos. La temperatura del horno para la columna se fijó a 30 °C. Empleando esta técnica pudimos determinar los componentes mayoritarios: ácido gálico, procianidina B<sub>2</sub>, y (-) epicatequina y catequina, identificados por tiempo de retención y confirmando su identidad mediante el espectro de absorción.

Finalmente, con el objeto de determinar si estos compuestos eran responsables de la actividad sedante detectada, se procedió a realizar el test de sueño inducido por pentobarbital sódico para el seguimiento de la actividad farmacológica comprobando que la fracción que presenta mayor actividad tiene como componentes mayoritarios: (+) catequina, procianidina B<sub>2</sub> y (-) epicatequina.

## **F. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo de investigación se ha realizado el estudio fitoquímico y neurofarmacológico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K, especie utilizada popularmente en distintos países de Iberoamérica. El trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto de colaboración con el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Dentro de los ensayos que el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense realiza para dicho programa, se encuentran los test de actividad sobre el SNC. Con esta finalidad se realizaron dos extractos de la mencionada especie utilizando como disolventes diclorometano y etanol/agua (8:2), estudiando su composición química y evaluando la actividad neurofarmacológica mediante un conjunto de técnicas.

Del trabajo realizado se puede concluir:

1. 1.- El screening fitoquímico por cromatografía en capa fina puso de manifiesto la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos y triterpenos en el extracto hidroalcohólico, comprobándose además la existencia de taninos en alta concentración. En este estudio se comprobó la existencia de aceites esenciales, triterpenos y saponinas como componentes mayoritarios el extracto diclorometano.
2. Previamente al estudio de la actividad neurofarmacológica se ha obtenido información acerca de la toxicidad aguda. Para ello, se ha calculado la  $DL_{50}$ , ésta quedó establecida en 1,5 g/Kg de peso. El extracto diclorometánico no presentó toxicidad a ninguna de las dosis ensayadas.
3. Con objeto de determinar la actividad neurofarmacológica de los extractos tanto diclorometánico como hidroalcohólico, se realizaron diversos test (actividad motora espontánea, curiosidad, temperatura rectal, coordinación motora y sueño inducido por pentobarbital sódico). Las dosis utilizadas fueron 0,5 g de planta/kg (1/3 de la Dosis Letal 50 ( $DL_{50}$ ) para el extracto hidroalcohólico y de 1,25 g de planta/kg para el extracto diclorometánico, respectivamente. Se ha observado un interesante efecto depresor del sistema nervioso central para el extracto hidroalcohólico y una escasa actividad del extracto diclorometánico a este nivel.

4. Se ha apreciado una acción analgésica y antiinflamatoria en los extractos diclorometánico e hidroalcohólico de la corteza de *B. crassifolia*. Se comprobó un efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico a las 7 horas duradero hasta las 24 horas y se puso de manifiesto un efecto analgésico tras la administración del extracto hidroalcohólico a lo largo de toda la prueba-
5. Se ha llevado a cabo el fraccionamiento del extracto diclorometánico para la separación de compuestos por cromatografía en columna flash. Mediante este método de fraccionamiento se ha conseguido aislar un compuesto que resultó ser una mezcla de isómeros. La elucidación estructural de los mismos permitió identificar  $\alpha$  y  $\beta$  amirina.
6. Se realizó el estudio en profundidad del extracto hidroalcohólico, realizando su purificación por eliminación de complejos macromoleculares estudiando e identificando por cromatografía líquido-líquido de alta eficacia los diferentes compuestos fenólicos presentes en el mismo: ac. protocatéquico, (+) catequina, procianidina B<sub>2</sub> y (-) epicatequina, siendo la (-) epicatequina mayoritaria.
7. El seguimiento de la actividad sobre sistema nervioso central se realizó mediante el test de inducción al sueño por pentobarbital sódico, determinándose que la fracción que contiene como componente mayoritario (-) epicatequina es la que presenta una mayor actividad.



## **G. BIBLIOGRAFÍA**

- Adachi, N., Tomonaga, S., Tachibana, T., Denbow, D.M, Furuse M. (2006). (-)-Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. *Eur J Pharmacol.* **15**,531-533.
- Agarwal, R., Mukhtar, H. (1996). Chemoprevention of photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol Chem* **63**, 440-444.
- Aguiar, RM., David, J.P., David, J.M. (2005) Unusual naftoquinones, catequin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *J Phytochem* **66**, 2388-2392.
- Alves, G.L., Franco, M.R.B. (2003) Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich) *J Chromatogr* **985**, 297-301.
- Bastianetto, S., Quirion, R. (2002) Natural extracts as possible agents of brain aging *Neurobiol Aging* **23**, 891-897.
- Béjar, E., Malone, M.H. (1993) Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *J Ethnopharm* **39**, 141-158.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M. (2000) Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine. *Stud Nat Prod Chem* **24**, 799-844.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A., Del Rio, J.A. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* **45**, 4505-15.
- Berger, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter, C.M., Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi* *J Ethnopharm* **62**, 107-115.
- Bernal, H.Y., Correa, J.E. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio de Andrés Bello. Tomos II, VIII, X y XII. 1ª Edición. Ed. Guadalupe Ltda. Santa Fé de Bogotá. Colombia. (1998).
- Boisser, J.R., Simon, P. (1967) Le test de la curiosité pour l'étude du psicolépticos *Therapie* **22**, 467.
- Bonacorsi, C., Raddi, M.S.G., Carlos, I.Z., Sannomiya, M., Vilegas, W. (2009) Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae)". *BMC Complement Altern Med Categories* **9**, 2.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**, 317-333.
- Bruneton, J. (1991). Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia.

- Cáceres, A., Lopez, B; Girón., M.A. (1991) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extract. *J Ethnopharm* **31**, 263-276.
- Cáceres, A., Lopez, B., Juárez, X. (1993) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infeccions. 2. Evaluation of actifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharm* **40**, 207-213.
- Cáceres, A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Colección Monografías. Guatemala. Ed. Universitaria.
- Campbell, E.L., Chebib, M., Johnston, G.A. (2004). The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol* **15**, 68-76.
- Catapano, A.L. (1997) Antioxidant effects of flavonoids. *Angiology* **48**, 39-44.
- Cardoso, C.R.P., Colus, I.M.S., Bernardi, C.C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda, E.A. (2006). Evaluation of mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicol* **225**, 55-63.
- Chen, Y., Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 137-49.
- Cook, N.C; Samman, S. (1996). Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* **7**, 66- 76.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press.
- De Andrés, A.I., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar del Fresno, A.M. (1999). Effects of extract of *Cistus populifolius* L. on the central nervous system. *Phytother Res* **13**, 575-579.
- Ding, L.A. (1990). Inhibition effect of epicatechin on phenobarbitol-induced proliferation precancerous liver cells. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. **19**, 261-3.
- Dorr, M., D. Jayce, R.D., Porsolt, H., Steinberg, A., Summerfield, N., Tomkiewicz, S. (1971). Persistence of dose related behavior in mice. *Nature* **231**, 121-123.
- Dunham, M.W., Miya, T.S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Pharm Assoc* **46**, 208-209.
- Faria, O., Pestana, D., Teixeira, D., Azevedo, J., de Freitas, V., Mateus, N., Calhau, C. (2010). Flavonoid transport across RBE4 cells: a blood-brain barrier model. *Cell Mol Biol Lett* **15**, 234-241.

- Fernandez, S., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav* **77**, 399-404.
- Formica, J.V., Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **33**, 1061-80.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H. (1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* **57**, 2916-2921.
- Fujimori, H., Cobb, D. (1965). Central nervous system depressant activity of Ma1337, 3-[3,4- M- chlorophenyl – 1-piperazyl propyl]-1-2-4 (1H,3H) quinoxalinedione hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther.* **148**, 151– 157.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark- *Phytochemistry* **39**, 635-643.
- Grayer, R.J. (1989). *Methods in plant biochemistry* 1. Ed. Academic Press.
- Groundwater, P.W., Solomons, K.R.H., Drewe, J.A., Munowar, M.A. (1996). Protein tyrosine kinase inhibitors. *Prog Med Chem.* **33**, 233-329.
- Gupta, M.P. (1995). 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Ed. Presencia.
- Hagerman, A.E., Rice, M.E., Rritchard, N.T. (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicateching (4→8) catechin (procyanidin). *J Agric Food Chem* **46**, 2590-2595.
- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (2005). Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* **66**, 5-29.
- Hiller, O.K., Zetler, G. (1996). Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioural and Anticonvulsant properties *Phytother Res* **10**, 145-151.
- Huang, M.T., Ferraro, T. (1992). Phenolic compounds in food and cancer prevention. In: M.T. Huang, C.T.Ho and C.Y. Lee (eds.) *Phenolic Compounds in Food and Health: II. Antioxidants and Cancer Prevention. ACS Symp Ser* **507**, 48–52.
- Konneh, M., Caen, J. (1998). Red Wine compounds and their putatives antiatherogenic properties. *Polyphenols* **96**, 105-115.
- Kuo, S.M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* **110**, 41-48.
- Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Finnegan-Olive, T., Lou, Y.R., Mitchell, J.M., Laskin, J.D., Newmark, H., Yang, C.S., Conney, A.H. (1992).

- Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* **13**, 947–954.
- Irwin, S. (1962). Drug screening and evaluate procedures *Science* **136**, 123-26.
- Jensen, A.G., Hansen, S.H., Nielsen, E.U. (2001). Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Sci* **68**, 1593-1605.
- Lee, H.S., Widmer, B.W. (1996). Phenolic Compounds. In: Handbook of Food Analysis, Nollet, L.M.L., Ed. Marcel Dekker, New York.
- Litter, M. (1976). Farmacología. 4ª Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**, 581-93.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M.J., Pizza, C., Della Loggia, R. (2009). Screening of the topical antiinflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakolev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *J Ethnopharm* **122**, 430-433.
- Markham K.R., Bloor, S.J. (1998). Analysis and identification of flavonoids in practice. In: Flavonoids in Health and Disease. Ed. Marcel Dekker.
- Martinez-Vazquez, M., Gonzalez, A.R., Cazares, L., Moreno, M.N., García-Argáez, A.N. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crasifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharm* **66**, 79-82.
- McMurrough, L., Byrne, J.R. (1992) HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages, Ed. Marcel Dekker.
- Morales-Cifuentes, C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar del Fresno, A.M. (2001). Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. *J Ethnopharm* **76**, 223-228.
- Morales-Cifuentes, C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar del Fresno, A.M., Cáceres, A. (2001). Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. *Farmaco* **56**, 523-526-
- Morton, J. (1981). Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Ed. Charles C. Thomas.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.

- Mustafa, R.A., Hamid, A.A., Mohamed, S., Bakar, F.A. (2010). Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Food Chem* **75**, 28-35.
- Newmark HL. (1996). Plant phenolics as potential cancer prevention agents. In: *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Ed. Plenum Press.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009). Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 270-278.
- Paris, R.R., Moyse, H. (1981). *Precis de Matière Medicale*. Ed. Maloine.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen, F., Noh, A., May, F., Simá, P., Dumonteil, E., García, M.R., Mut, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Phytoterapy* **78**, 315-318.
- Perez-Gutiérrez, R.M., Perez, J.A., Garcia L.M., Sossa, H. (1998). Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. *J Ethnopharm* **62**, 43-48.
- Pérez-Gutiérrez, R.M., Muñoz-Ramírez, A., Gómez, Y., Bautista, E. (2010). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and Antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Food Hum Nutr* **65**, 350-357.
- Pothier, J., Cheav, L.S., Galnad, N., Dormeau, C., Viel, C. (1998). A comparative study of the effects of spartine, lupenine and lupin extract on the central nervous system of the mouse. *J Pharm Pharmacol* **50**, 949-54.
- Reed, L., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- Rice-Evans, C. (1995). Plant polyphenols: Free radical scavengers or chain-breaking antioxidants. *Biochem Soc Sys* **61**, 103-116.
- Rocha, F.F; Lima-Landman, M.T.R., Soucarr, C., Tanae, M.M., De Lima, T.C.M., Lapa, A.J. (2007). Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents – *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. *Phytomed* **14**, 396-402.
- Romanczyk, L.J., Hammerstone, J.F., Buck, M.M., Post, L.S., Cipolla, G.G., Micccland, C.A., Mundt, J.A., Schmitz, H.H. (1997). Cocoa Extract Compounds and Methods for Making and Using the Same. *Patent Cooperation Treaty WO 97/36497*, USA, mars incorporated.
- Sannomiya, M., Cardoso, C.R.P., Figueiredo, M.E; Rodrigues, C.M; dos Santos, L.C., dos Santos, F.V., Serpeloni, J.M., Colus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A.

- (2007). Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss leaf extracts. *J Ethnopharm* **112**, 319-326.
- Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Souza, A.R.M., Vilegas, W. (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J Ethnopharm* **97**, 1-6.
- Saxena, R.S., Gupta, B., Lata, S. (2002). Tranquilizing, antihistaminic and purgative activity of *Nytanthes arbor tristis* leaf extract. *J Ethnopharm* **81**, 321-25.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond *Am J Clin Nutr* **81(1)** 215-217.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* **101**, 1012-1018.
- Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A., Rees, J.F., Rogez, H., Larandelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chem* **106**, 331-339.
- Skoog, A.D., Leary, J.J (1994). Análisis Instrumental Ed. McGraw-Hill.
- Stanley, P.C., Steyermark, J.A. (1949). Flora of Guatemala. *Fieldiana Bot* **24**, 31-35.
- Steenbergen, H.L., Farabollini, F., Heinsbroek, R.P., Van de Poll, N.E. (1991), Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav Brain Res* **43(2)**, 159-165.
- Still, W.C., Kann, M., Mitra, A. (1978). Rapid Chromatographic Technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* **43**, 2923-25.
- Suschetet, M., Siess, M.H., Le Bon, A.M., Canivenc-Lavier, M.C. (1998). *Anticarcinogenic properties of some flavonoids*. Ed. INRA.
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., Fukuuchi, Y. (2002). Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int* **40**, 441-8.
- Ticktin, T., Dalle, S.P (2005). Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras. *J Ethnopharm* **96**, 233-248.
- Turner, A.R. (1965). Screening methods in pharmacology. Ed. Academic Press.
- Vignes, M. Mauric,e T., Lanté, F., Nedjar, M., Thethi, K., Guiramand, J., Récasens, M. (2006) Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res.* **19**,1110.
- Villar del Fresno, A.M. (1999). Farmacognosia General. Ed. Síntesis.

- Vinson, J.A. (1998). Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. *Adv Exp Med Biol* **439**, 151-164.
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L.S. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J Agric Food Chem.* **46**, 3630-3634.
- Williamson, E.M., Okpako, P.T., Evans, P.J. (1996). Pharmacological Methods in Phitotherapy Research. Vol. I: Selection, preparation and pharmacological evaluation of Plant Material. Ed. Wiley.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962). Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Proc Soc Exp Biol Ther* **111**, 544-547.
- Wollgast, J., Anklam, E.E. (2000). Review on polyphenols in theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res* **33**, 423-447.